

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Chemie

Chemie v přírodních vědách



Pavel Dušek

Konjugáty porfyrinu pro MRI

Porphyrine conjugates for MRI

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Pavel Vojtíšek, CSc.

PRAHA 2013

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 28. srpna 2013

Rád bych na tomto místě poděkoval panu doc. RNDr. Pavlu Vojtíškovi, CSc. za odborné vedení mé bakalářské práce a cenné připomínky. Další dík patří panu doc. RNDr. Janu Kotkovi, Ph.D. za četné konzultace a drahocený čas věnovaný řešení problémů experimentální části práce, panu doc. RNDr. Vojtěchu Kubíčkovi, Ph.D. za praktické rady, panu Mgr. Miroslavu Pniokovi za pomoc při size-exclusion chromatografii a všem ostatním z laboratoří 313 a 324 za kolegiální, přátelský přístup, pomoc při měření spekter NMR a četné rady. Dále bych rád poděkoval panu doc. MUDr. Ing. Jaroslavu Plasovi za poskytnutí obrázků z klinické praxe. V neposlední řadě bych rád vyjádřil dík i své rodině za trpělivost a morální, psychickou i materiální podporu.

Bez všech těchto lidí by tato bakalářská práce nemohla vzniknout.

# Obsah

<b>Seznam zkratk a symbolů</b>	<b>6</b>
<b>1 Cíl a motivace práce</b>	<b>10</b>
<b>2 Teoretická část</b>	<b>12</b>
2.1 Fyzikální podstata a klinický význam MRI . . . . .	12
2.1.1 Magnetické vlastnosti vodíkových jader . . . . .	12
2.1.2 Vytváření prostorového obrazu . . . . .	14
2.1.3 Vznik kontrastu v jednotlivých tkáních . . . . .	15
2.1.4 Rozšířené způsoby zobrazování . . . . .	16
2.1.5 Princip funkce kontrastních látek pro MRI . . . . .	21
2.1.6 Přehled klinicky používaných látek . . . . .	22
2.1.7 Distribuce kontrastních látek v organismu . . . . .	22
2.1.8 Klinické využití kontrastních látek pro MRI . . . . .	25
2.1.9 Srovnání s jinými zobrazovacími metodami . . . . .	28
2.2 Porfyriny v lidském těle . . . . .	32
2.3 Předchozí práce s konjugáty porfyrinů pro MRI . . . . .	33
<b>3 Experimentální část</b>	<b>35</b>
3.1 Použité chemikálie . . . . .	35
3.2 Použité laboratorní metody . . . . .	35
3.2.1 NMR Spektroskopie . . . . .	35
3.2.2 Size-exclusion chromatografie . . . . .	35
3.2.3 UV-VIS spektroskopie . . . . .	35
3.3 Syntetická část . . . . .	36
3.3.1 Příprava makrocyclické části . . . . .	36
3.3.2 Konjugace makrocyclů s porfyrinem . . . . .	38
<b>4 Výsledky a diskuze</b>	<b>46</b>
<b>5 Závěr</b>	<b>49</b>

<i>Seznam zkratek a symbolů</i>	5
<b>6 Literatura</b>	<b>50</b>

# Seznam zkratek a symbolů

$\Delta E$	rozdíl dvou energetických stavů
$\gamma$	gyromagnetický poměr
$\hbar$	Diracova konstanta, redukovaná Planckova konstanta
$\int$	$n$ -rozměrný integrál, kde $n$ je počet rozměrů polohového vektoru $\mathbf{r}$
$\mathbf{k}$	$k$ -vektor
$\mathbf{r}$	polohový vektor
$\mathbf{u} \cdot \mathbf{v}, x \cdot y$	skalární součin vektorových veličin $\mathbf{u}$ a $\mathbf{v}$ , součin skalárních veličin $x$ a $y$
$\mu$	velikost magnetického momentu
$\mu_z$	$z$ -tová složka magnetického momentu
$\nabla$	gradient vektorového pole
$\omega_0$	Larmorova frekvence odpovídající stacionárnímu poli
$\rho(\mathbf{r})$	kontrast vytvářející funkce
$B_0$	magnetická indukce stacionárního pole
$E$	energie
$e$	Eulerova konstanta
$I$	jaderný spin
$i$	imaginární jednotka
$I_{SE}$	intenzita signálu spin-echo sekvencí
$m_I$	magnetické spinové číslo jádra
$S$	signál MRI registrovaný v závislosti na $k$ -vektoru

$T_1$	longitudinální relaxační čas, spin-lattice relaxační čas
$T_2$	transverzální relaxační čas, spin-spin relaxační čas
$T_2^*$	transverzální relaxační čas pod vlivem difuze a nehomogenit lokálního magnetického pole
$TE$	časový interval mezi excitačním pulzem a registrací spin-echo signálu
$TI$	<i>inversion time</i> , čas inverze
$TR$	<i>repetition time</i> , časový interval mezi opakovanými excitačními pulzy
$x, y, z$	jednotlivé složky polohového vektoru $\mathbf{r}$
5-ALA	5-D-aminolevulenová kyselina
$H_4do3ap^{ABn}$	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinová}
$H_4do3ap^{IBn}$	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl)methyl]fosfinová}
$H_4do3ap^{NBn}$	kyselina 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl[(4-nitrofenyl)methyl]fosfinová}
ASL-MRI	<i>arterial spin-labeling magnetic resonance imaging</i> , arteriální spinové značení
BOLD	<i>blood-oxygen-level dependent contrast imaging</i>
BOPTA	4-karboxy-5,8,11-tris(karboxymethyl)-1-fenyl-2-oxa-5,8,11-triazatridekan-13-oato(5-)]gadolinová kyselina
BPA	<i>blood pool agent</i> , kontrastní látky s výhradně intravaskulární biodistribucí
CE-MRA	<i>Contrast-enhanced magnetic resonance angiography</i>
CIS	klinicky izolovaný syndrom
CSF	<i>cerebrospinal fluid</i> , mozkomíšní mok
CT	<i>computed tomography</i> , počítačová tomografie
DMSO	dimethylsulfoxid
DO3A	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7-trioctová kyselina

DOTA	1,4,7,10-tetraazacyklododekan-1,4,7,10-tetraoctová kyselina
DSC-MRI	<i>dynamic susceptibility contrast magnetic resonance imaging</i>
DTPA	diethylenetriamin-pentaoctová kyselina
DWI	<i>diffusion-weighted imaging</i> , difuzně vážený sken
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimid
FLAIR	<i>fluid-attenuated inversion recovery</i>
fMRI	<i>functional MRI</i> , funkční magnetická rezonance
GBCA	<i>gadolinium-based contrast agents</i>
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i>
KL	kontrastní látka
MRA	<i>magnetic resonance angiography</i> , magnetická rezonanční angiografie
MRI	<i>magnetic resonance imaging</i>
NMR	nukleární magnetická rezonance
NSF	<i>nephrogenic systemic fibrosis</i> , nefrogenní systémová fibróza
PBG	porfobilinogen
PET	<i>positron emission tomography</i> , pozitronová emisní tomografie
PWI	<i>perfusion-weighted imaging</i> , perfuzně vážený sken
RF	radiofrekvenční
RS	roztřoušená skleróza, <i>sclerosis multiplex</i>
SIPP	<i>superparamagnetic iron platinum particles</i>
SPECT	<i>single-photon emission computed tomography</i> , jednofotonová emisní počítačová tomografie
SPIO	<i>superparamagnetic iron oxide</i>
T	tesla, jednotka magnetické indukce
THF	tetrahydrofuran
TMS	tetramethylsilan



TOF-MRA	<i>Time-of-Flight magnetic resonance angiography</i>
TPAPP	5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenyl)porfyrin
USG	ultrasonografie, ultrazvukové vyšetření
USPIO	<i>ultrasmall superparamagnetic iron oxide</i>

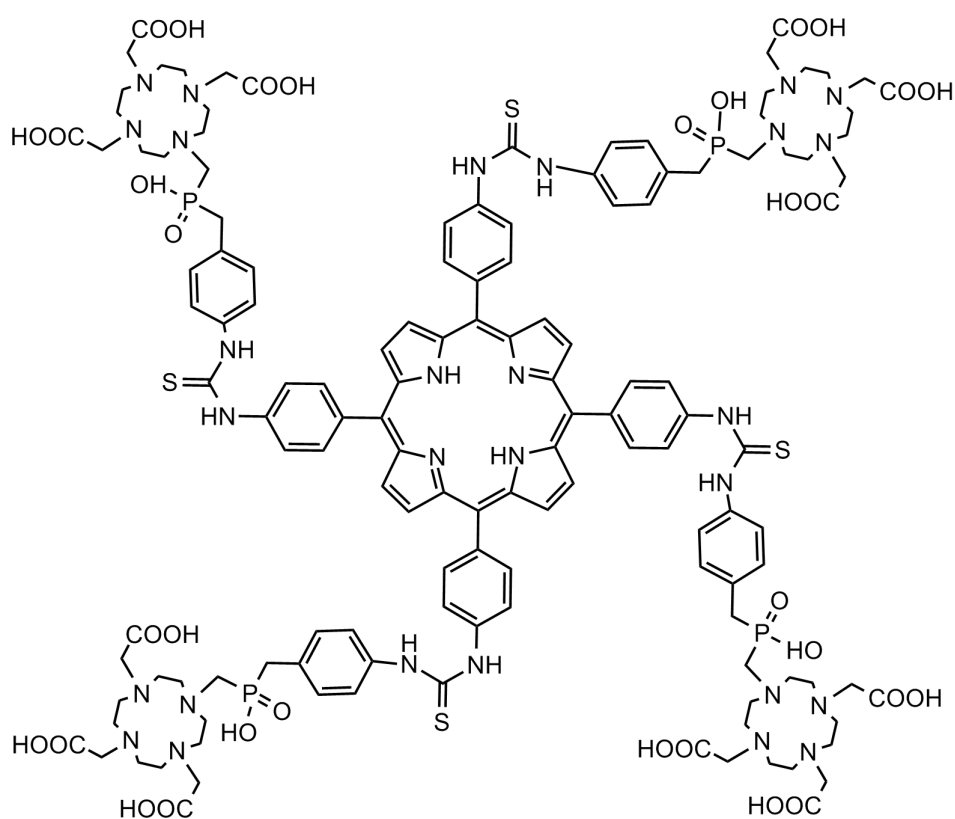
# 1 Cíl a motivace práce

Cílem této práce je stručný přehled a srovnání jednotlivých zobrazovacích metod používaných v medicíně a shrnutí možností funkčního zobrazování pomocí nukleární magnetické rezonance zejména s využitím kontrastních látek. Záměrně je na toto často zpracovávané téma také částečně nahlíženo z pro chemickou veřejnost neobvyklého pohledu z klinické praxe. Takto vzniklý přehled je využit k návrhu potenciální kontrastní látky založené na porfyrinovém skeletu (viz obrázek 1.1). Porfyrinová struktura hemu a její schopnost přenášet molekulu kyslíku koordinačně vázanou na atomu železa je základem BOLD fMRI (viz oddíl 2.1.4). Navržená látka obsahující hemový strukturní motiv spolu s makrocyklem nesoucím gadolinité ionty by mohla být užitečná především při použití MRI jako „funkční“ zobrazovací metody.

Navržená molekula by mohla být synteticky dostupná konjugací dvou stavebních jednotek: 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenyl)porfyrinu (TPAPP) a kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové} ( $H_4do3ap^{ABn}$ ).

Jedním z cílů této práce je také ověření, zda konjugace  $H_4do3ap^{ABn}$  s volnými aminoskupinami po aktivaci thiofosgenem, často popisovaná v literatuře<sup>1</sup>, je použitelná i pro porfyrinové systémy.

Obrázek 1.1: Navržený konjugát porfyrinu a makrocyklu komplexujícího gadolinité ionty.



## 2 Teoretická část

### 2.1 Fyzikální podstata a klinický význam MRI

Magnetická rezonance (MRI, *magnetic resonance imaging*) je jednou ze stěžejních zobrazovacích metod současné medicíny. Je založena na měření hustoty a relaxačních časů vodíkových jader ve vnějším magnetickém poli.

První, jednorozměrný obraz pomocí metody MRI vytvořil v roce 1952 americký fyzik Herman Carr<sup>2,3</sup>. Na jeho práci navázala řada dalších pracovních skupin, v sedmdesátých letech zejména americký chemik Paul Lauterbur<sup>4</sup>, který nasnímal 3D skeny živé myši<sup>5</sup>, a britský fyzik Peter Mansfield, který jeho metodu zdokonalil zavedením rychlejších algoritmů pro zpracování signálu a umožnil tak získat kvalitnější obraz<sup>6</sup>. Oba v roce 2003 obdrželi Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu. V roce 1977 získal arménsko-americký lékař Raymond Damadian první MRI snímek lidského těla.

Klinické využití metody zaznamenalo velký boom v osmdesátých letech, kdy australský fyzik Paul Bottomney se svým týmem vyřešil některé technické problémy běžného provozu a sestrojil přístroj pro celotělové snímkování s magnetickým polem o indukci 1,5 T (ref.<sup>7</sup>). Dnes se experimentálně používají pole s indukcí až o 9,4 T, pro zvířecí studie dokonce 21,1 T. V klinické praxi jsou nejběžnější přístroje s polem 1,5 T, které se staly základním vybavením moderních zdravotnických zařízení a používají se v širokém spektru nejrozličnějších indikací<sup>8</sup>.

#### 2.1.1 Magnetické vlastnosti vodíkových jader

Všechna atomová jádra s lichým protonovým či neutronovým číslem mají nenulový celkový jaderný spin  $I$ . Vzhledem k tomu, že jádro atomu je kladně nabitě, má magnetický moment, pro jehož velikost  $\mu$  platí

$$\mu = \gamma \hbar \sqrt{I(I+1)} \quad (2.1)$$

kde  $\gamma$  je gyromagnetický poměr tohoto jádra. Orientace  $z$ -tové složky magnetického momentu  $\mu_z$  odpovídá magnetickému spinovému číslu  $m_I$ :

$$\mu_z = \gamma \hbar m_I \quad (2.2)$$

U jader izotopu vodíku  $^1\text{H}$ , která jsou v biologických systémech zastoupená nejhojněji, může  $m_I$  nabývat dvou hodnot:  $-\frac{1}{2}$  a  $\frac{1}{2}$ .

Ve vnějším magnetickém poli s indukcí o velikosti  $B_0$  se tento původně náhodně prostorově distribuovaný magnetický moment orientuje ve směru či proti směru tohoto pole, což se označuje jako *Zeemanův jev*. Orientace shodná se směrem vnějšího magnetického pole mírně převažuje a pro energii  $E$  každého z těchto dvou stavů platí

$$E = -\mu_z B_0 = -\gamma \hbar m_I B_0 \quad (2.3)$$

a pro rozdíl energií obou stavů  $\Delta E$  potom

$$\Delta E = \gamma \hbar B_0 \quad (2.4)$$

Kolem směru vnějšího pole vykonává magnetický moment precesní pohyb s frekvencí  $\omega_0$  označovanou jako Larmorova:

$$\omega_0 = \frac{\gamma \hbar B_0}{h} = \frac{\gamma B_0}{2\pi} \quad (2.5)$$

Aplikací radiofrekvenčního pulzu (*RF pulse*) se orientace magnetického momentu jader vychýlí, a pokud se frekvence RF pulzu shoduje s Larmorovou frekvencí daného jádra, stačí malé excitační energie a směr momentu se tak může podle velikosti a délky trvání pulzu změnit až o  $90^\circ$  (*90°-pulse*), resp.  $180^\circ$  (*180°-pulse*). Po této změně je precese jednotlivých jader ve fázi a postupně se desynchronizuje s časovou konstantou  $T_2$  (*transverse relaxation time, spin-spin relaxation time*), což se označuje jako *dephasing*. Návrat do původní termodynamické rovnováhy s převahou jader v energeticky výhodnějším stavu zohledňuje časová konstanta  $T_1$  (*longitudinal relaxation time, spin-lattice relaxation time*). Celková magnetizace jednotlivých jader precedujících ve fázi je dostatečně velká na to, aby byla měřitelná makroskopicky jako radiofrekvenční záření vyzařované relaxujícími jádry.

Relaxační čas  $T_1$  je možné měřit několika způsoby, jednou v praxi využívanou metodou je tzv. *saturation recovery experiment*, během níž se opakuje několik  $90^\circ$  pulzů oddělených intervalem  $TR$  (*repetition time*), jenž je tak krátký, že se magnetizace u všech jader nestihne vrátit do rovnovážného stavu, což zapříčiní, že signál naměřený po druhém pulzu je méně intenzivní než po prvním. S prodlužujícím se  $TR$  se tento rozdíl stírá a ze směrnice nárůstu intenzity signálu se dá přímo určit čas  $T_1$ . Další často

užívanou metodou je *inversion recovery experiment*, při kterém se nejprve aplikuje  $180^\circ$  pulz a po čase  $TI$  (*inversion time*)  $90^\circ$  pulz, který otočí magnetizaci do roviny kolmé ke směru vnějšího magnetického pole, a následně se registruje signál vyzářený během relaxace. Podobně jako u předchozí metody se provede několik měření pro různé inverzní časy, z nichž pak lze spočítat relaxační čas  $T_1$ <sup>9</sup>.

Časová konstanta průběhu intenzity signálu po osamoceném  $90^\circ$  pulzu (*free induction decay*) sice odpovídá relaxačnímu času  $T_2$ , ale za běžných podmínek bývá tato hodnota silně zkreslena difúzí jednotlivých molekul<sup>3</sup>, gradientem magnetického pole a rozdílnými chemickými posuny okolních molekul; označuje se potom jako čas  $T_2^*$ . K měření samotného  $T_2$  se používá takzvaného *spin echo experimentu* (*Hahn echo decay method*) navrženého v roce 1950 americkým fyzikem Erwinem Hahnem<sup>17</sup>, při kterém se v čase  $TE/2$  po  $90^\circ$  pulzu aplikuje  $180^\circ$  pulz, který eliminuje vliv spontánní desynchronizace jader precedujících ve fázi. Otočením magnetického momentu o  $180^\circ$  se totiž rozdíly mezi frekvencemi precese jader přestanou zvětšovat a začnou vyrovnávat a přesně v čase  $TE$  nastane znovu stav, kdy budou všechny momenty ve fázi. Signál měřený v tomto okamžiku se označuje jako *spin echo* a jeho měřením pro různé  $TE$  se získá přímo samotný relaxační čas  $T_2$  (ref.<sup>3,9</sup>).

### 2.1.2 Vytváření prostorového obrazu

Protože limit rozlišení dvou různých prostorových zdrojů elektromagnetického záření závisí na vlnové délce, která pro jádro vodíku v poli s magnetickou indukcí 1,5 T odpovídá přibližně 5 m, difrakce záření omezuje použití běžných optických metod\*. Pro určení místa vyzáření radiofrekvenčního pulzu je tedy třeba využít jiné metody než prostého měření směru, odkud dorazil.

V praxi používaná metoda pro vytváření obrazu je založena na gradientu magnetického pole – pomocí gradientových cívek je kromě statického pole s indukcí  $\mathbf{B}_0$  v každém bodu prostoru  $\mathbf{r}$  (tzv. *voxel*, většinou s prostorovým rozlišením  $3 \times 3 \times 3$  mm) navíc vytvořena lehce odlišná intenzita magnetického pole  $\mathbf{B}$  s lineárním gradientem  $\nabla \mathbf{B}$  podle předem zvolených os. Tomu potom odpovídá Larmorova frekvence

$$\omega = \gamma B_0 + \gamma \nabla \mathbf{B} \cdot \mathbf{r} \quad (2.6)$$

---

\* Dosazením do rovnice 2.5 za  $B_0 = 1,5$  T a  $\gamma = 26,75 \cdot 10^7 \text{ T}^{-1}\text{s}^{-1}$  získáme hodnotu frekvence rádiových vln vyzářených vodíkovými jádry cca 64 MHz, což přibližně odpovídá vlnové délce  $\lambda = 5$  m. Abbeho difrakční limit  $d$  je

$$d = \frac{\lambda}{2n \sin \theta} = \frac{\lambda}{2a}$$

kde  $n$  je index lomu prostředí,  $\theta$  je polohel šterbiny a  $a$  je numerická apertura. Dosadíme-li pro hrubý odhad rozlišení za  $a$  hodnotu dosahovanou optickými přístroji  $a = 1,4$ , potom  $d = 1,8$  m, což řádově odpovídá rozlišení dvou opačných konců lidského těla.

Výsledný signál  $S$  je registrován v tzv.  $k$ -prostoru, což je prostor vektoru  $\mathbf{k}$  definovaného takto:

$$\mathbf{k} = \gamma \nabla B t \quad (2.7)$$

To je nutné opakovat při různých gradientech a případně aplikovat i několik  $180^\circ$  pulzů, aby se celý  $k$ -prostor zaplnil signálem  $S$

$$S(\mathbf{k}) = \int \rho(\mathbf{r}) \cdot e^{i\mathbf{k} \cdot \mathbf{r}} d\mathbf{r}, \quad (2.8)$$

kde  $\rho(\mathbf{r})$  je funkce zodpovědná za vznik kontrastu v obraze, jež závisí zejména na hustotě jader v daném prostoru a časech  $T_1$  a  $T_2$ . Tato funkce zároveň reprezentuje samotný obraz, který lze ze signálu získat přímo Fourierovou transformací.

V praxi existují dva způsoby sběru dat a to *2D měření* a *3D měření*<sup>10</sup>. Při 2D měření jsou před vysláním monofrekvenčního pulzu nastaveny gradientové cívky tak, aby se vnější magnetické pole lineárně měnilo pouze ve směru osy  $z$  (orientované od hlavy k nohám pacienta), takže dojde k *selektivní excitaci* jednoho tenkého axiálního řezu, v němž se  $\omega$  přesně shoduje s frekvencí pulzu. Cívky gradientů ve směru os  $x$  a  $y$  jsou zapnuty až ve chvíli, kdy se registruje signál;  $k$ -prostor i Fourierova transformace jsou potom dvoudimenzionální. Toho se využívá zejména pro *spin echo sekvence*. Při 3D měření se selektivně excituje určitý objem tkáně (tzv. *slab*) a  $k$ -prostor i Fourierova transformace jsou trojdimenzionální, což v sobě nenese artefakty příliš nízké intenzity signálu u tenkých řezů a artefakty vzniklé částečnou excitací řezů vedlejších. S výhodou se používá tzv. *gradient echo* sekvencí, které jsou na rozdíl od *spin echo* sekvencí založeny na jiných než  $90^\circ$  pulzech (většinou  $10$ – $80^\circ$ ) a využívají k nim samotné gradientové pole. Jak ve 2D, tak v 3D měřeních může registrace probíhat v polárních souřadnicích; do kartézských je převedena pomocí algoritmu *filtered back projection* používaného i v počítačové tomografii.

### 2.1.3 Vznik kontrastu v jednotlivých tkáních

Nejjednodušší relativně přesný matematický model intenzity signálu u často používaných spin-echo sekvencí  $I_{SE}$  závisí na hustotě protonů v tkáni  $N$ , relaxačních časech  $T_1$  a  $T_2$  a volenými časy  $TE$  a  $TR$  takto<sup>9</sup>:

$$I_{SE} = (N) e^{-\frac{TE}{T_2}} \left( 1 - e^{-\frac{TR}{T_1}} \right) \quad (2.9)$$

Krátké  $T_1$  tedy způsobí zvýšení intenzity signálu, dlouhé  $T_1$  její snížení (a při měření je pak nutné prodlužovat čas  $TR$ ). U času  $T_2$  je to přesně naopak, krátké  $T_2$  způsobí zeslabení signálu a dlouhé  $T_2$  jeho zesílení.

Jádro vodíku v excitovaném stavu oproti energeticky preferované variantě se vrací ke své původní orientaci dvěma způsoby — spontánním vyzářením energie v rádiové oblasti spektra a zároveň interakcemi s fluktuujícím magnetickým polem pohybujících se okolních jader. Tyto interakce jsou četnější při zvyšující se teplotě a viskozitě prostředí. Fluktuace magnetického pole všech frekvencí jsou schopné do jisté míry desynchronizovat jádra precedující ve fázi a účinnost závisí převážně na jejich intenzitě, proto je závislost relaxačního času  $T_2$  na viskozitě prostředí při konstantní teplotě monotónně klesající. Návrat jádra z energeticky nevýhodné do energeticky výhodnější hladiny mohou zapříčinit pouze fluktuace, které se svou frekvencí blíží frekvenci Larmorově pro dané jádro; graf závislosti  $T_1$  na viskozitě při konstantní teplotě má tedy v těchto oblastech viskozity výrazné minimum. Tkáně s nízkou viskozitou tak budou mít dlouhý  $T_1$  i  $T_2$ , tkáně se střední viskozitou budou mít minimální  $T_1$  a průměrně dlouhý  $T_2$  a tkáně s viskozitou velkou pak budou mít dlouhý  $T_1$  a minimální  $T_2$  (ref.<sup>9</sup>).

Vždy platí, že  $2T_1 \geq T_2$ , ale  $T_1$  bývá v biologických systémech sám o sobě natolik velký (100–2000 ms, ref.<sup>9</sup>), že pokud jsou v jednotce objemu různé molekuly, např. molekuly vody navázané na makromolekulách a molekuly vody volné, dojde k naměření jedné, „průměrné“ hodnoty. Relaxační čas  $T_2$  v biologických systémech naopak bývá velmi krátký (30–100 ms, ref.<sup>9</sup>), proto je možné často naměřit z daného voxelu několik hodnot odpovídajících volné a vázané vodě. Pokud však pro některá jádra  $T_2$  nepřesáhne hodnotu kolem 3 ms, dojde k tak rychlému poklesu signálu, že ho přístroj nestihne změřit, a tato jádra se ve výsledcích metody vůbec neprojeví.

### 2.1.4 Rozšířené způsoby zobrazování

Kontrast obrazu v MRI je vždy dán kombinací přinejménším tří faktorů: hustotou jader, relaxačním časem  $T_1$  a relaxačním časem  $T_2$  v různých místech tkáně. Vliv některého z těchto faktorů lze částečně potlačit vhodně zvolenými excitačními sekvencemi; pak se do určité míry nepřesně mluví o *hustotně váženém*,  *$T_1$ -váženém* a  *$T_2$ -váženém* obrazu. Vedle těchto základních modů se používá i celé spektrum dalších způsobů zobrazování, která poskytují informaci nejen o morfologickém rozložení tkáně, ale i o jejím funkčním chování. Mezi rozšířené způsoby zobrazování, které jsou běžně klinicky využívány, patří: perfuzní sken, difuzní sken, tkáňově vážené mody, magnetická rezonanční angiografie a funkční magnetická rezonance.

#### Perfuzní sken

U mnoha onemocnění je důležité znát úroveň zásobení kapilárního řečiště tkáně krví, tzv. *perfuzi* této tkáně. K perfuznímu zobrazení tkáně (*perfusion-weighted imaging*, PWI) je možno použít dvou různých metody, buď *dynamic susceptibility contrast*



MRI (DSC-MRI) a metody arteriálního spinového značení (*arterial spin-labeling*, ASL-MRI).

První metoda využívá změny signálu po velmi krátkém a intenzivním, tzv. *bolusovém* podání MRI kontrastní látky (např. dimeglumin-gadopentetát, gadodiamid a další<sup>11</sup>, viz tabulka 2.1). Čím dál více však dnes začíná převažovat zcela neinvazivní metoda ASL-MRI, během které se radiofrekvenčním pulzem označí tepenná krev ještě před vstupem do daného orgánu (nejčastěji tepny zásobující mozek v krční oblasti). Pohyb takto označených molekul vody je pak v určitých časových sekvencích v cílovém orgánu snímán v čase  $TI$  (voleném tak, aby odpovídal přibližně perfuznímu času) pomocí  $T_1$ -váženého obrazu. Obraz PWI se pak získá odečtením takto získaného obrazu od běžného skenu bez použití arteriálního značení<sup>12</sup>. S výhodou se používá třítlesových polí, v nichž dlouhý čas  $T_1$  zajišťuje dostatečně intenzivní signál vody prošlé stěnou kapilár<sup>13</sup>.

Obraz vytvořený pomocí ASL-MRI ve většině případů odpovídá obrazu získaného pomocí DSC-MRI<sup>14</sup> s lehce horším poměrem signálu vůči šumu<sup>15</sup> (*signal-to-noise ratio*). Velmi přesně se také podobá standardu perfuzního skenování, pozitronové emisní tomografii se značením tepenné krve pomocí  $H_2^{15}O$ , přestože nepoužívá ionizujícího záření ani aplikace jakékoliv cizorodé látky<sup>13</sup>.

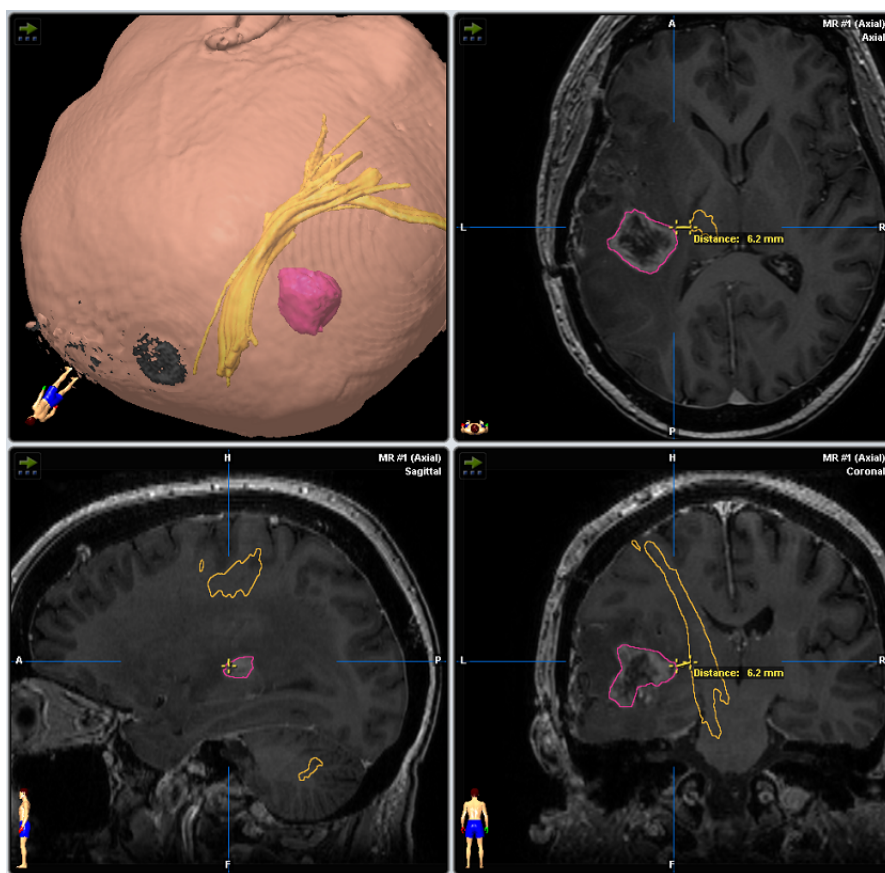
Klinicky se ASL-MRI využívá zejména při cévní mozkové příhodě k prokázání nedostatečného zásobení tkáně krví (*ischémie*) a tím vyloučení neischemických, ale mozkovému infarktu podobných stavů (Toddova paréza, migréna s motorickým deficitem a mnohé další)<sup>14</sup>. Je přínosná jak při akutní diagnostice, tak i při sledování vývoje choroby a úspěšnosti léčby<sup>13,15</sup>. Další využití najde v diagnostice mozkových nádorů pro určení biologické agresivity nádorové tkáně (*grading*) prokazováním novotvorby cév a sledování účinku chemoterapie potlačující angiogenezi<sup>15</sup>.

## Difuzní sken

Na rozdílné rychlosti difuze molekul vody v tkáni je založena metoda difuzně váženého MRI (*diffusion-weighted imaging*, DWI). Při ní jsou aplikovány dva gradientové pulzy měnící rychlost precese, jejichž účinek se v daném bodě v prostoru přesně vyruší. Pokud se však mezi těmito pulzy molekula přesune difuzí do místa, kde je gradient pole jiný, rychlost rozfázování příčné magnetizace bude lehce vyšší než odpovídá spontánní příčné relaxaci, což vede k poklesu intenzity signálu v daném místě<sup>16</sup>.

Vzhledem k tomu, že axony neuronů umožňují difuzi preferenčně ve směru jejich vedení, používá se difuzních skenů k zobrazování bílé hmoty mozkové a dlouhých nervových drah (tzv. traktografie), např. u roztroušené sklerózy, difuzního axonálního poškození či jako předoperační mapování důležitých spojů v okolí operovaného místa (viz obrázek 2.1). Dalším velmi důležitým příkladem využití difuzního zobrazování,

Obrázek 2.1: Předoperační traktografie u pacienta s glioblastomem. Znázorněn vztah motorické dráhy (žlutě) k operovanému nádoru (růžově). Zdroj: Neurochirurgická klinika 1. LF UK.



zejména ve spojení s PWI, je prokazování tzv. *penumbry* u akutních ischemických cévních mozkových příhod. Penumbra je tkáň špatně zásobená krví (snížená perfuze), ale ještě bez iontové nerovnováhy na membráně buněk (normální difuze), tedy tkáň, která má rozdílné obrazy v PWI a v DWI, tzv. *PWI/DWI mismatch*, a pravděpodobně vyžaduje reperfuční terapii.

### Tkáňově vážené mody

Správnou volbou inverzního času  $TI$  tak, že

$$TI = T_{1,\text{tissue}} \cdot \ln 2 \quad (2.10)$$

je možné získat  $T_2$ -vážený obraz s potlačeným signálem té tkáně, která má longitudinální relaxační čas  $T_1 = T_{1,\text{tissue}}$ . Nejčastěji se tohoto způsobu zobrazování používá pro potlačení signálu mozkomíšního moku (*cerebrospinal fluid*, CSF) —  $T_{1,\text{CSF}}$  v rozmezí

1800–2500 ms — a metoda se pak označuje jako *fluid-attenuated inversion recovery* MRI (FLAIR).

Klinicky nachází FLAIR využití při prokazování lézí lokalizovaných ve strukturních v těsné blízkosti tkáňového moku, které jsou v  $T_2$ -obrazu zastíněny jeho intenzivním signálem. Jedná se zejména o postižení mozkové kůry a podkoří (tzv. *kortikální a juxtakortikální léze* roztroušené sklerózy, subarachnoideální krvácení atd.), v blízkosti mozkových komor (tzv. *periventrikulární léze* roztroušené sklerózy) či přímo v mozkových komorách (axiální nádory).

### Magnetická rezonační angiografie

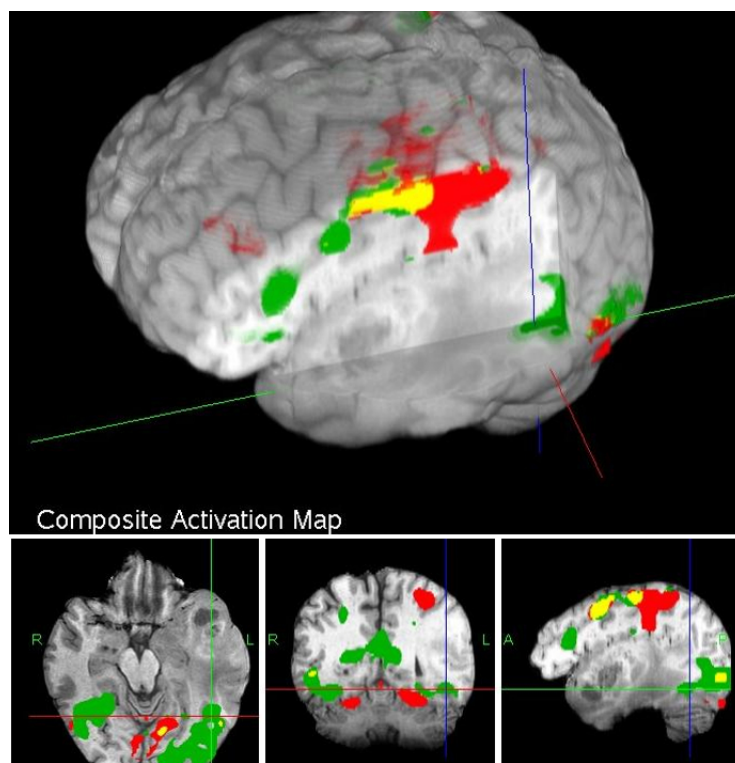
Magnetická rezonanční angiografie (*magnetic resonance angiography*, MRA) je soubor metod zobrazujících krevní tok. Nejčastěji používaná metoda *Time-of-Flight* (TOF-MRA) je schopná zobrazit velké a středně velké tepny. Je založena na potlačení signálu nepohybující se tkáně ve snímané rovině. Krev, která do této roviny přitéká, již byla excitovaná v rovině jiné a jeví se tedy jako hypersignální (tzv. *white blood* způsob zobrazování). Metoda TOF-MRA je naprosto neinvazivní, bez podání jakýchkoliv kontrastních látek. Obraz je většinou skládán do trojrozměrné projekce (3D rekonstrukce obrazu známá např. z počítačové tomografie), při níž se tepny nezobrazují v řezech, ale jako prostorová síť, kterou je možné prohlížet a hodnotit natočenou do různých úhlů. Používá se zejména k prokázání akutního zúžení či uzavěru tepny u cévních mozkových příhod.

Další metodou, která je již založena aplikací kontrastních látek a která je schopna s dostatečnou přesností zobrazit i žilní systém, je metoda *Contrast-enhanced magnetic resonance angiography* (CE-MRA). Klinicky se používá např. k prokázání žilní trombózy mozkových splavů (viz kapitola 2.1.8).

### BOLD fMRI

Přestože perfuzně a difuzně vážené skeny vypovídají také o funkci tkáně, jako funkční zobrazování magnetickou rezonancí (*functional MRI*, fMRI) se nejčastěji označuje metoda BOLD, *blood-oxygen-level dependent contrast imaging*.

Využívá několik fyzikálních a celou řadu fyziologických vztahů. Ve své podstatě měří BOLD množství oxygenovaného a deoxygenovaného hemoglobinu. Oxyhemoglobin je diamagnetický a má nízkou magnetickou susceptibilitu; naproti tomu je deoxyhemoglobin díky svým čtyřem nespárovaným elektronům atomu železa paramagnetický (vysokospinové  $\text{Fe(II)}\ 3d^6$ ). Projevuje se u něj tedy intenzivní efekt zvýšené magnetické susceptibility a silně zkracuje čas  $T_2^*$ . Arteriální krev s vysokým poměrem oxy-/deoxygenovaného hemoglobinu tak má delší čas  $T_2^*$  než krev venózní a tudíž i vyšší intenzitu signálu<sup>18</sup>.



Obrázek 2.2: Předoperační fMRI u pacientky s glioblastomem temporálně vlevo s plánovanou resekcí nádoru. Červeně jsou zobrazena motorická centra (*finger tapping test*), zeleně řečová centra, žlutě překryv obou center. Zdroj: Neurochirurgická klinika 1. LF UK.

Dalším principem, na kterém fMRI staví, je skutečnost, že mozková tkáň patří mezi tkáně s vlastním řízením krevního průtoku. Neurony nemají prakticky žádnou signifikantní možnost udržovat rezervu kyslíku pro svůj aerobní metabolismus. V případě, že se v určitém místě zvýší neuronální aktivita, zvýší se i přesun iontů přes buněčnou membránu, spotřeba ATP pro udržení membránového potenciálu a spotřeba kyslíku ve tkáni. Reakcí na to je rozšíření cév ve snaze zvýšit zásobení tkáně kyslíkem. Naměřený signál je slabý, ale opakováním té samé stimulační aktivity se dá statisticky získat přijatelný poměr signálu vůči šumu. Odpověď cév (*hemodynamic response function*) je mnohem pomalejší než změny v neuronální aktivitě a zahrnuje širší oblast tkáně, čímž limituje měření aktivity (fyziologicky, ne instrumentálně) maximálním časovým rozlišením 3–4 s a maximálním prostorovým rozlišením  $0,025 \text{ cm}^3$ . Cévní odpověď se navíc lehce liší napříč populací a i u stejného jedince jak v jednotlivých místech mozku, tak i v různých okamžicích života na tom samém místě, ale tyto rozdíly při správném navržení měření a správném statistickém zpracování dat výsledky nijak neruší.

Kromě extenzivního experimentálního použití nachází fMRI klinické uplatnění např. při hledání nejvhodnějších operačních cest do hlubokých struktur mozku. Pokud je mozkový nádor uložen v hloubce, musí k němu operátor při jeho resekci přistupovat

skrze struktury, jejichž protětí co nejméně poškodí pacienta, a musí se vyhnout strukturám důležitým pro život a jeho kvalitu. Uložení některých důležitých struktur, jako např. motorická a senzitivní kůra či zraková dráha, se v populaci příliš neliší. Pro jiné struktury jako např. řečová kůra, paměťová centra, vedlejší motorická centra toto neplatí – mohou se lišit třeba stranovým uložením a fMRI po opakovaném pronášení slov se tak využívá k prokázání, že řečová a další centra neleží v plánovaném operačním přístupu (viz obrázek 2.2).

### 2.1.5 Princip funkce kontrastních látek pro MRI

Kontrastní látky (KL) pro MRI fungují na principu zkracování relaxačních časů, které vyústí ve změnu intenzity signálu podle rovnice 2.9. Ke zkrácení relaxačních časů dochází díky paramagnetické povaze KL, která zvyšuje fluktuace magnetického pole a usnadňuje přenos energie jak mezi excitovanými protony a prostředím, tak mezi excitovanými protony navzájem<sup>9</sup> (srov. oddíl 2.1.3). Schopnost kontrastní látky zkracovat původní relaxační čas  $T_0$  (tj.  $T_1$  nebo  $T_2$ ) na pozorovaný relaxační čas  $T_{\text{obs}}$  se popisuje pomocí veličiny zvané relaxivita  $r_0$ , která je definována vztahem

$$\frac{1}{T_{\text{obs}}} = \frac{1}{T_0} + r_0 c_{\text{KL}} \quad (2.11)$$

kde  $c_{\text{KL}}$  je koncentrace kontrastní látky (typicky v desetinách mmol/l).

Uvedený efekt platí jak pro relaxační čas  $T_1$ , tak pro relaxační čas  $T_2$ , míra ovlivnění je však u obou časů různá. Většina současných kontrastních látek jsou takzvané pozitivní kontrastní látky (zvyšují intenzitu signálu), jejichž efekt je nejvíce patrný v  $T_1$ -váženém obraze při  $TR$  voleném mezi 400–700 ms a  $TE$  co nejkratším, tj. 20 ms nebo méně<sup>9</sup>. Změna kontrastu se projeví ve tkáních, které původně měly dlouhé  $T_1$  – a jeho zkrácení je tak nejvýraznější – a zároveň disponují velkým distribučním objemem pro danou kontrastní látku. U extravaskulárních extracelulárních kontrastních látek (tj. většiny klinicky používaných KL, viz oddíl 2.1.7) se tedy jedná o tkáň s objemným mezibuněčným prostorem (pojivová tkáň, mozkové léze atd). Přítomnost extravaskulárních extracelulárních kontrastních látek se naopak vůbec neprojeví v tkáních se zanedbatelným mezibuněčným prostorem, jako jsou játra, normální svalová tkáň a normální mozková tkáň<sup>9</sup>. Pro svůj vysokospinový stav slouží jako pozitivní kontrastní látky zejména cheláty lanthanoidů (komplexy  $\text{Gd}^{3+}$ ) a manganatých kationtů.

Jako negativní kontrastní látky, které snižují intenzitu signálu silným vlivem na relaxační čas  $T_2$ , slouží zejména superparamagnetické oxidy železa.

### 2.1.6 Přehled klinicky používaných látek

Klinicky používané kontrastní látky pro MRI určené pro jiné než perorální užití jsou v současné době pouze látky obsahující gadolinité kationty (*gadolinium-based contrast agents*, GBCA). Dříve bylo Evropskou lékovou agenturou a americkou *Food and Drug Administration* schváleno pro intravenózní aplikaci i několik negativních kontrastních látek na bázi superparamagnetických oxidů železa (*superparamagnetic iron oxide*, SPIO a *ultrasmall superparamagnetic iron oxide*, USPIO). Výroba některých však byla ukončena a ostatním byla registrace pro intravenózní podání odebrána; v současnosti jsou pouze v některých zemích aplikovány perorálně. Jako látka k perorálnímu podání pro zobrazování gastrointestinálního traktu jsou v České republice registrovány produkty obsahující síran barnatý.

Superparamagnetické fosfolipidové imunomicely s obsahem železa a platiny (*superparamagnetic iron platinum particles*, SIPP) a paramagnetické komplexy manganu pro užití při MRI jsou zatím pouze ve stadiu výzkumu, jejich klinické využití je možné v budoucnu. Jediné registrované látky na bázi komplexů manganu Teslascan® byla registrace odebrána na žádost výrobce<sup>24</sup>.

Přehled současných GBCA uvádí tabulka 2.1, jejich chemická struktura je uvedena na obrázku 2.3.

### 2.1.7 Distribuce kontrastních látek v organismu

Kontrastní látky pro MRI založené na gadolinu v současné době registrované pro klinické použití jsou jediné, které mohou být podávány intravenózně, což je zásadní pro distribuci v organismu<sup>21</sup>. Eliminují se takřka okamžitě po podání v nezměněné formě ledvinami, biologický poločas má široké rozmezí od 1,5 hod. u zdravých jedinců přes 4–8 hod. u jedinců se středně závažným poškozením ledvin až po 18–34 hod. u jedinců se závažně sníženými renálními funkcemi<sup>21</sup>. Tato skutečnost je dáвана do spojitosti s výskytem nefrogenní systémové fibrózy u pacientů s poškozením ledvin po podání KL (viz oddíl 2.1.9). Eliminace z organismu odpovídá dvoukompartimentovému modelu s plasmatickou koncentrací  $C_p$ :

$$C_p = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}, \quad (2.12)$$

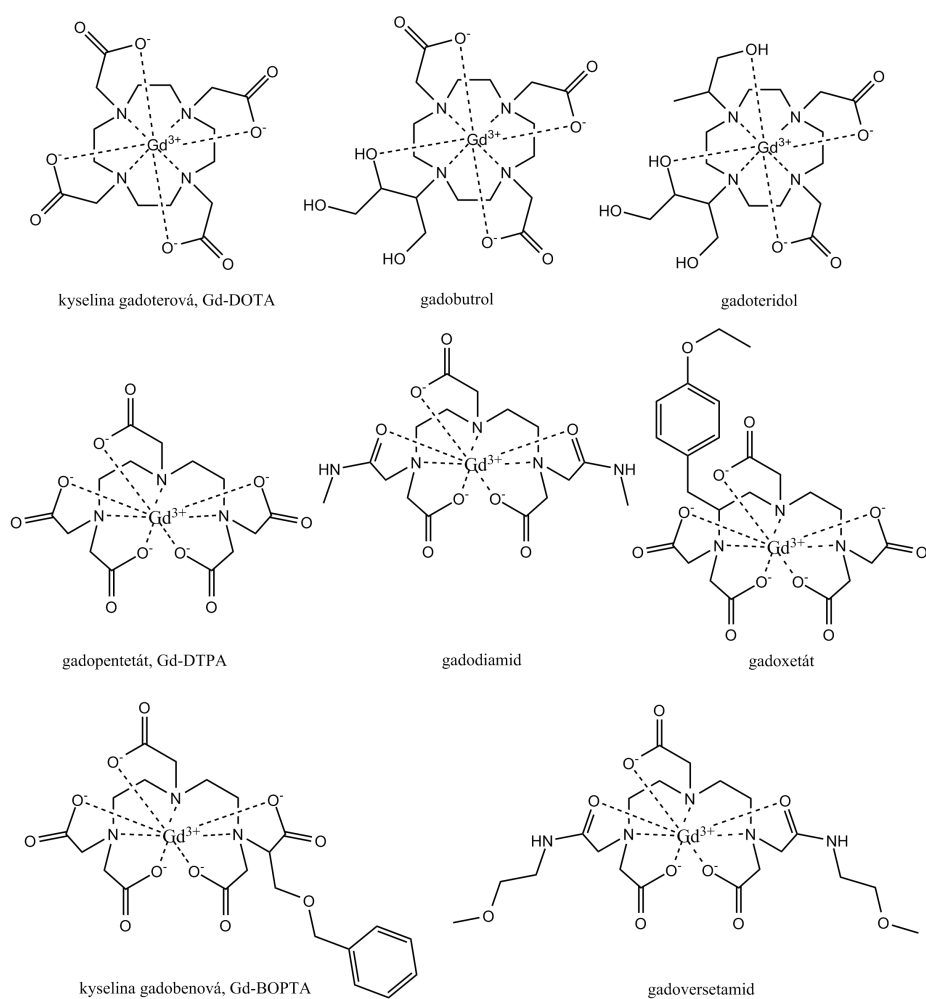
kde  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$  a  $\beta$  jsou eliminační farmakokinetické konstanty charakteristické pro každou kontrastní látku.

Pro většinu látek je doporučená dávka 0,1 mmol/kg tělesné hmotnosti. Při MRA se někdy používá dvojnásobná až trojnásobná dávka. Pro většinu KL je schválená maximální dávka gadolinia 0,3 mmol/kg tělesné hmotnosti, jen u preparátů MultiHance® a Primovist® je to 0,1 mmol/kg, resp. 0,025 mmol/kg tělesné hmotnosti<sup>22</sup>.

Tabulka 2.1: Přehled klinicky používaných kontrastních látek na bázi gadolinia (stav k 21.8.2013, ref. <sup>26,21,22</sup>). Názvy účinných látek uváděny dle souhrnu údajů o přípravku jednotlivých preparátů a dle ref. <sup>21</sup>.

Preparát	Účinná látka	zobrazovaná část těla	povaha	struktura
Dotarem®	kyselina gadoterová, Gd-DOTA	mozek a mícha, plíce, srce, prsa, játra, pankreas, ledviny, pánev, muskuloskeletální systém	iontová	cyklická
Gadovist®	gadobutrol, Gd-DO3A-butrol	mozek a mícha, celotělové skeny	neutrální	cyklická
Magnebita®, Magne-tolux®, Magnevist®	dimeglumin-gadopentetát, Gd-DTPA	mozek a mícha, celotělový sken, klouby	iontová	lineární
MultiHance®	dimeglumin-gadobenát, Gd-BOPTA	mozek a mícha, játra, MRA	iontová	lineární
Omniscan®	gadodiamid	mozek a mícha, celotělový sken	neutrální	lineární
Optimark®	gadoversetamid, Gd-DTPA-BMEA	mozek a mícha, játra	neutrální	lineární
Primovist®	gadoxetát, Gd-EOB-DTPA	játra	iontový	lineární
ProHance®	gadoteridol, Gd-HP-DO3A	mozek a mícha, hlava a krk, prsa, játra, pánev, muskuloskeletální systém	neutrální	cyklická

Obrázek 2.3: Chemická struktura klinicky používaných komplexů gadolinia. Názvy uvedeny dle souhrnu údajů o přípravku jednotlivých preparátů<sup>26</sup>. (Upraveno podle ref.<sup>21</sup> a ref.<sup>23</sup>.)





Kontrastní látka gadofosveset patří jako jediná mezi KL s výhradně intravaskulárním typem distribuce (*blood pool agent*, BPA), tj. neopouští cévní systém. Tento typ distribuce je docílen silnou vazbou lipofilní bisfenylcyklohexylové skupiny na plazmatický albumin, který pro svou velikost neprochází stěnou kapilár. Vzhledem k vysokým koncentracím v cévním systému přetrvávajícím po dlouhou dobu se využívá pro magnetickou rezonanční angiografii (viz oddíl 2.1.4). Látky s lipofilními skupinami mají tendenci být vylučovány přes játra; tomu je u gadofosvesetu zabráněno přítomností nabitě fosfodiesterové vazby, takže je vylučován ledvinami stejně jako většina ostatních KL. Jediným klinicky používaným preparátem byl Vasovist® později přejmenovaný na Ablavar®, kterému ale byla odebrána registrace<sup>25</sup>, takže v současné době není v Evropě žádný BPA klinicky používán. MRA se proto provádí s aplikací ostatních KL ve vyšších dávkách.

Látky, které jsou schopny procházet cévní stěnou, pronikají do mezibuněčného prostoru a označují se jako extravaskulární. To platí pro všechny intravenózně podávané KL kromě gadofosvesetu. Většina zůstává pouze v mezibuněčném prostoru; takové se označují jako extracelulární. Biodistribuce je u všech z nich takřka shodná, rozdíl spočívá v odlišné kumulaci v mezibuněčné tkáni chrupavky u látek s iontovou a neiontovou povahou. Iontové látky jsou odpuzovány negativně nabitými glykosaminoglykany, proto je jejich koncentrace v chrupavce nižší.

Látky, které jsou po přestupu z krevní plazmy přes cévní stěnu do mezibuněčného prostoru aktivně transportovány přes buněčnou membránu do cytosolu jaterních buněk, se tak navíc kumulují i uvnitř buněk a označují se jako intracelulární. Tento transport přes membránu hepatocytů umožňuje lipofilní benzylová skupina, kterou obsahuje dimeglumin-gadobenát (MultiHance®) a gadoxetát (Primovist®). Ty jsou tedy díky tomu kromě vylučování ledvin do určité míry (2–4 %, resp. 50 %) vylučovány i játry. Využívají se proto k zobrazování hepatobiliárních cest a jaterního parenchymu.

### 2.1.8 Klinické využití kontrastních látek pro MRI

Klinicky využívané kontrastní látky až na uvedené výjimky mění kontrast obrazu výhradně pasivně na základě rozdílného prostupu stěnou cév. Přes hematoencefalickou bariéru neprocházejí vůbec, proto se v neurodiagnostice využívají s výhodou k prokázání onemocnění, která mají hematoencefalickou bariéru porušenou. To zahrnuje v první řadě cévy patologicky novotvořené rostoucím nádorem, kterému stávající cévní zásobení nepostačuje a který produkuje růstové faktory pro vznik cév nových. V druhé řadě jde o cévní stěnu pozměněnou zánětlivým procesem, u něhož se prostupnost kapilár zvyšuje v reakci endotelu na zánětlivé mediátory s cílem umožnit imunitnímu systému eliminovat původce zánětu (přestup leukocytů do tkáně atd.).

Podobné mechanismy se využívají i při zobrazování jiných částí těla než mozku a míchy, např. u zánětu šlach či zánětu malých kloubů páteře při diagnostice onemocnění pohybového aparátu (časná diagnostika sakroiliitidy u ankylozující spondylitidy – Bechtěrevovy choroby). Prostá aplikace kontrastní látky intraartikulárně umožňuje zobrazení nitrokloubních lézí, jako např. úrazy chrupavčitých částí kloubních jamek (*labral tear injury*) a natržení kloubních vazů. Intravenózní aplikace výhradně intravaskulárních látek (BPA) se využívá při angiografii metodou CE-MRA. Výjimku tvoří kontrastní látky určené pro zobrazování jater, u nichž nejde o pasivní přestup do cíleného místa či přímou aplikaci, ale jedná se o aktivní transport kontrastní látky přes membránu do cytoplazmy transportními proteiny hepatocytů. Případy, kdy se kontrastní látky klinicky využívají, velmi záleží na možnostech, zkušenostech a zavedené praxi jednotlivých pracovišť, kdy je nutné dle klinických příznaků výše uvedená onemocnění potvrdit či vyloučit. Rozhodnutí, zda podání kontrastní látky během MRI vyšetření přinese informaci navíc, která je důležitá pro stanovení diagnózy či volbu průběhu terapie, není vždy jednoduché a po zvážení všech možných nežádoucích účinků a případných rizik a kontraindikací u konkrétního pacienta záleží vždy na indikujícím lékaři, zda vyšetření doporučí, a na edukovaném rozhodnutí pacienta, zda vyšetření MRI podstoupí v podobě rozšířené o podání kontrastních látek.

Existují však situace, v nichž je kontrastní MRI *zlatým standardem*, či se mu přinejmenším blíží. Následuje několik konkrétních příkladů alterace cévního zásobení ilustrujících přínos samotného podání kontrastních látek v klinické praxi. Dva uvedené příklady demonstrují metabolické schopnosti pozměněné tkáně kumulovat kontrastní látku, v jednom případě tkáně pozměněné zánětem, v druhém případě nádorem<sup>†</sup>. Třetí příklad prezentuje MRA jinak špatně zobrazitelných žil uvnitř lebky.

### Roztroušená skleróza

Roztroušená skleróza (*sclerosis multiplex*; RS) je velmi závažné chronické onemocnění, při němž zánětlivé procesy poškozují struktury obalujících výběžky neuronů s obsahem myelinu. Jedná se tedy o léze bílé hmoty, zejména tzv. dlouhých drah. Následkem je zpomalené vedení vzruchů, které se dle místa léze může projevit nejrozličnějšími symptomy včetně poškození zraku, řeči a funkcí autonomního nervového systému, popř. ztráty hlubokého i povrchového citu a motorické obrny. Onemocnění probíhá v prudkých zhoršeních zdravotního stavu, tzv. *atakách*, po kterých může dojít částečnému přechodnému zlepšení a podle kterých se rozlišují různé formy RS.

---

<sup>†</sup>Obraz kontrastního MRI u pacienta s probíhajícím zánětem a u pacienta s nádorem může vzhledem ke zvýšené prostupnosti cév v obou případech vypadat shodně. Většinou je ale možné oba případy od sebe rozlišit pomocí klinických známek a jiných vyšetření.

Při stanovení diagnózy RS je nutné vyloučit tzv. *klinicky izolovaný syndrom* (CIS); jedná se pouze o jednorázovou ataku, která je svými příznaky totožná s atakou RS, ale již se největší pravděpodobností nebude opakovat a není tedy nutné podávat nákladnou terapii zlepšující prognózu opakovaných atak, která v sobě může nést potenciálně vážné nežádoucí účinky (interferon  $\beta$ , glatiramer acetát, natalizumab a další léky). Aktivita nemoci se v období po první atace prokazuje velmi obtížně, její stanovení je však velmi zásadní pro rozhodnutí, zda se jedná o CIS či o RS a zda je nutné poskytnout RS modifikující léčbu.

MRI vyšetření bez kontrastních látek se využívá v průběhu první ataky pro vyloučení možných jiných příčin uváděných příznaků. Vyloučení probíhá na základě prokázání lézí typických pro CIS a RS (léze kolmé na komory, juxtakortikální léze ve FLAIR, léze dlouhých drah např. v míše); nativní MRI však samo o sobě neumožňuje spolehlivé rozlišení CIS a ostatních forem RS. Navíc se ukazuje, že objem morfologicky postižené tkáně měřené pomocí MRI nekoreluje s intenzitou klinických příznaků.

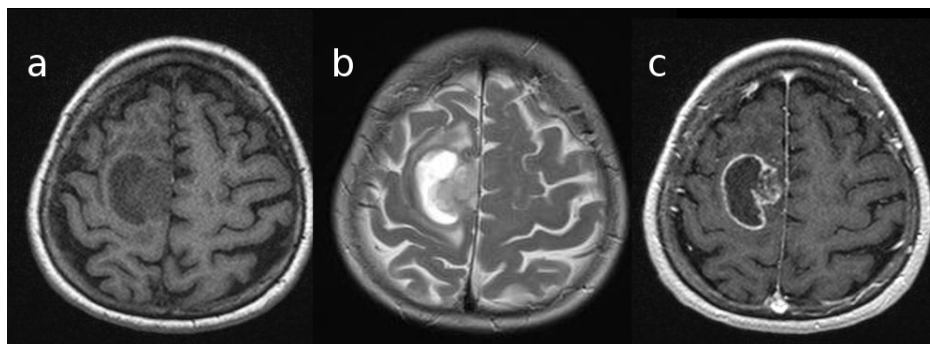
MRI s podáním kontrastních látek je oproti nekонтastnímu zobrazování cenné svojí schopností prokázat aktivitu onemocnění v období mezi klinicky pozorovatelnými atakami; kontrastní látky se kumulují v místě zvýšeného přestupu přes cévní stěnu, tedy i v místech, v nichž probíhá zánětlivý proces. Hypersignální místa nově vzniklá po první atace se v kontrastním MRI objevují ještě před vznikem samotné morfologické léze, která způsobí další ataku, a také dříve, než se objeví její klinické příznaky<sup>27</sup>. Kontrastní látky tak pomáhají předpovědět chování zánětlivého procesu a umožňují brzy optimálně nastavit léčbu odpovídající závažnosti a prognóze onemocnění.

### Využití v neuroonkodiagnostice

V onkologické diagnostice obecně platí pravidlo histologicky potvrzené diagnózy. Bez ní nelze předepsat radikální léčbu, která s sebou vždy přináší vysoké riziko nežádoucích účinků. Regenerace mozkové tkáně je však velmi omezená; chirurgický odběr vzorků pro mikroskopii je tedy nutné provádět s velkou rozvahou a uvedená zásada v neuroonkologii neplatí zcela stoprocentně. K biopsii se přistupuje v případech, kdy nelze jinými dostupnými metodami s velkou jistotou zjistit charakter tkáně<sup>‡</sup>.

Nádory kvůli svému intenzivnímu metabolismu vyžadují nadměrné zásobení živinami a mnohé jsou schopné si jej zajistit novotvorbou cév. Tyto cévy jsou nekvalitní, mají sklon ke krvácení a zvýšenou propustnost látek přes kapilární stěnu. Vyšetření pomocí MRI s podáním kontrastních látek přináší informaci nejen o cévní propustnosti a zásobení tkáně živinami, ale umožňuje také hodnotit případné krvácení do nádoru či

<sup>‡</sup>Velké množství nádorů v oblasti hlavy tvoří sekundární tumory, metastazovaný nádor z jiného lokusu. Metastázy je třeba vyloučit, v opačném případě se provádí biopsie v primárním nádoru.



Obrázek 2.4: Pacientka s glioblastomem —  $T_1$ -vážený obraz (a),  $T_2$ -vážený obraz (b) a  $T_1$ -vážený obraz po podání kontrastní látky Gadovist (c). V  $T_1$ -obrazu je patrná hyposignální oblast, z těchto tří skenů je zde nález nejméně výrazný; v  $T_2$ -obrazu na snímku dominuje lokální otok tkáně, který ji kvůli své intenzitě neumožňuje hodnotit; v obrazu po podání kontrastní látky je nápadný hypersignální lem živých agresivně rostoucích nádorových buněk (tzv. *ring sign*), které kumulují kontrastní látku, a střed tvořený odumřelou tkání, což svědčí pro nádor s vysokou malignitou. Zdroj: Neurochirurgická klinika 1. LF UK.

odumírání některých jeho oblastí. Celý morfologický obraz tak vypovídá o biologické povaze a malignitě nádoru (viz obrázek 2.4).

### **Trombóza intrakraniálních žilních splavů**

Pro zobrazení arteriálního řečiště lze použít MRA i bez pomoci kontrastních látek (metoda TOF-MRA, viz oddíl 2.1.4). Zobrazování procesu v žilním intrakraniálním řečišti se však bez jejich podání neobejde. Jedním z takových příkladů je i hluboká trombóza žilních splavů; jde o srážení krve v žilách, které odvádějí krev z mozku. Onemocnění postihuje zejména pacienty se sklonem k vyšší srážlivosti krve a projevuje se typicky prudkými bolestmi hlavy, ale i postižením zraku, motorickými výpadky a dalšími symptomy, kterými může imitovat cévní mozkovou příhodu. U pacienta s odpovídajícími klinickými příznaky, u nichž není protrombotický stav vyloučen pomocí rozboru krve, je indikováno MRI s podáním kontrastních látek. To prokáže případné zúžení, neprůchodnost či abnormálně vyvinutou část žilních splavů a pacient pak dostává antikoagulační či dokonce trombolytickou léčbu.

### **2.1.9 Srovnání s jinými zobrazovacími metodami**

Magnetická rezonance ve své základní podobě zobrazuje zejména morfologickou stavbu tkání. Ve svých modalitách je ale schopná zobrazit i jejich funkci, podobně jako metody nukleární medicíny – pozitronová emisní tomografie (*positron emission tomography*, PET) a jednofotonová emisní počítačová tomografie (*single-photon emission computed tomography*, SPECT). Ty mají ve funkčním zobrazování výhodu, že mohou jako zářiče

použit velké množství rozličných molekul, např. 2-deoxy-2-( $^{18}\text{F}$ )fluoro-D-glukóza jako sken metabolismu glukózy,  $^{123}\text{I}^-$  jako sken funkce štítné žlázy,  $^{123}\text{I}$ -ioflupan jako sken funkce dopaminergních receptorů, značené protilátky a mnohé další.

Na rozdíl od čistě morfologické metody počítačové tomografie (*computed tomography*, CT), která je vhodná pro zobrazení tvrdých tkání, má MRI nejvyšší rozlišení u tkání měkkých. V porovnání s CT a metodami nukleární medicíny také používá neionizující záření, takže pacientovi nepřináší radiační zátěž ani v podobě jeho nedeterministických účinků. Nevýhody oproti počítačové tomografii spočívají v nemožnosti provést vyšetření u pacientů s kovovými implantáty (viz níže), v menší dostupnosti MRI, řádově dvojnásobné ceně jednoho vyšetření a také větší časové náročnosti a náročnosti na spolupráci pacienta. Standardní MRI sken hlavy trvá kolem 15 minut, zatímco CT sken hlavy bez použití kontrastních látek trvá několik vteřin. Tato vyšší časová náročnost a zejména menší dostupnost přístrojů ve spádové oblasti vylučuje ve většině případů MRI z akutní diagnostiky, kde hrozí nebezpečí z prodlení<sup>§</sup>.

Podobně jako ultrasonografie (USG) je MRI ve své základní podobě bez použití kontrastních látek neinvazivní, narozdíl od ní je však schopná zobrazit i prostory ohraničené kostní tkání, od které se ultrazvuk odráží, což se při vyšetření pomocí USG projeví jako černý neprůhledný „stín“. Ultrasonografie je však mnohem levnější a dostupnější<sup>¶</sup>, oproti MRI je také schopná zobrazování v reálném čase a ultrasonografista přímo vidí pohyb orgánů či nástrojů, čímž se z vyšetření stává i vyšetření funkční. Toho se také využívá kupříkladu při ultrazvukem kontrolovaných malých chirurgických výkonech. S rozvojem pokročilých algoritmů, které umožňují rychle zpracovávat data z magnetické rezonance v podobě *real-time MRI*, se však tento rozdíl pomalu stírá. Real-time MRI si postupně nachází uplatnění při zobrazování kloubů v pohybu a zejména v kardiologii, kde však stále dominuje rutinní ultrazvukové vyšetření, které využívá „kostních oken“ v hrudním koši, a případně se kombinuje s endoskopickými metodami v podobě jícnové echokardiografie. Měkké tkáně hlavy, v dospělém věku kryté osifikovanou lebkou<sup>||</sup>, jsou pro ultrazvuk jen omezeně dostupné, proto v neurodiagnostice měkkých tkání dominuje právě MRI. Obdobná situace panuje v diagnostice nitrokloubních lézí, jelikož kloubní štěrbina je zpravidla ohraničena dvěma či více kostmi.

Zobrazování pomocí MRI je ve své podstatě v porovnání s ostatními zobrazovacími metodami velmi bezpečné. Není aplikováno ionizující záření; vliv magnetického pole na

---

<sup>§</sup>U závažných traumatologických případů, např. dopravních nehod, se používá k rychlé diagnostice celotělový sken CT, v případě cévních mozkových příhod je k rozlišení intracerebrálního krvácení a ischemie mozku, jež se klinicky jinak projevují naprosto totožnými symptomy, jako zlatý standard stále používán rychlý CT sken hlavy.

<sup>¶</sup>Vzhledem k ceně a velikosti zařízení se jedná o nejpoužívanější zobrazovací metodu vůbec, USG nechybí prakticky na žádném lůžkovém oddělení či specializované ambulanci.

<sup>||</sup>U novorozenců se sonografie hlavy rutinně používá.

Tabulka 2.2: Srovnání některých zobrazovacích metod včetně efektivní dávky ionizujícího záření a používané kontrastní látky<sup>33,34</sup>.

Zobrazovací metoda	Typ zobrazování	Vznik kontrastu	Radiační zátěž [mSv]	Kontrastní látky
MRI	morfologické, rozšířené módy funkční	hustota protonů, relaxační časy $T_1$ a $T_2$	žádná	paramagnetické látky
CT	morfologické	absorpce rentgenového záření	hlava 2 mSv, hrudník nebo břicho 8–10 mSv	atomy s vysokým nukleonovým číslem, např. I a Ba
USG	morfologické, echokardiografie funkční	odraz ultrazvuku	žádná	mikrobublínky vzduchu
Dopplerovská USG	funkční	změna frekvence ultrazvuku při pohybu tkáně	žádná	—
SPECT	funkční	zdroj $\gamma$ -záření	1–15 mSv dle typu vyšetření	$\gamma$ -zářič jako např. $^{99m}\text{Tc}$ , $^{111}\text{In}$ , $^{123}\text{I}$ , $^{67}\text{Ga}$
PET	funkční	zdroj $\beta^+$ -záření	1–9 mSv dle typu vyšetření	$\beta^+$ -zářič jako např. $^{18}\text{F}$ , $^{11}\text{C}$ , $^{13}\text{N}$ , $^{15}\text{O}$ , $^{82}\text{Rb}$

lidský organismus bývá sice diskutován, ale nebyly dosud prokázány žádné nežádoucí účinky. Účinek na kovové materiály je však velmi výrazný – zde hraje roli několik vlivů. Na feromagnetické materiály vystavené silnému statickému magnetickému poli působí síla, která může způsobit jejich posunutí, poškození okolních tkání, u implantovaných elektrod i ztrátu kontaktu. Kloubní náhrady, chirurgické svorky a další mechanické implantáty se proto dnes vyrábějí převážně z materiálů, které tento efekt minimalizují. Rychle proměnná gradientová pole a radiofrekvenční pulzy navíc indukují v kovech vířivé proudy, které způsobují silné zahřívání a poškození okolní tkáně. V implantovaných elektrických zařízeních tyto proudy navíc mohou změnit funkci nebo nastavení, způsobit chybnou registraci signálu senzory či zničit celé zařízení jako takové, čímž může být ohrožen život samotného pacienta<sup>19</sup>. Zejména se to týká defibrilátorů, implantovaných *cardiac-event* monitorů a kardiostimulátorů, které jsou absolutní kontraindikací pro MRI vyšetření. Některé radiofrekvenční pulzy mají přímo schopnost generovat srdeční arytmie<sup>19</sup>. Vyšetření pacientů s kochleárním implantátem vyžaduje předchozí chirurgické vynětí některých částí přístroje. U implantovaných zařízení pro hlubokou mozkovou stimulaci je možné provést sken hlavy při dodržení doporučených bezpečnostních opatření a rutinně se tak postupuje pro kontrolu uložení stimulačních elektrod, přičemž nežádoucí účinky vyšetření se vyskytují velmi zřídka<sup>20</sup>.

Podobně jako u CT přístrojů musí pacient při MRI ležet nehybně po dobu celého zobrazování v uzavřeném, velmi úzkém prostoru. Pacienti trpící klaustrofobií, kteří se v populaci vyskytují až v 10 %, však snášejí MRI vyšetření hůře vzhledem k delšímu času, který je nutný pro získání kvalitního obrazu, a hlasitějšímu hluku MRI zařízení. Někteří musí být premedikováni sedativy a pod lékařským dozorem, aby obraz nebyl zkreslen pohybovými artefakty, popř. dokonce aby bylo možné vyšetření vůbec uskutečnit.

Hluk, jehož intenzita se podle aplikovaného pole a gradientových pulzů pohybuje v rozmezí 80–120 dB<sup>28</sup>, je způsoben intenzivními vibracemi gradientových cívek s rychle proměnným magnetickým polem v silnějším poli statickém. Podle použitých gradientových sekvencí se liší frekvence, které jsou pro každý vyšetřovací mód charakteristické. V literatuře bývá diskutována otázka akustického poškození sluchu<sup>29,30</sup> a v praxi se jako ochranné pomůcky používají sluchátka. Ta mohou být zároveň použita k hudební produkci či ke komunikaci operátora s pacientem. Reproduktoři nesmí obsahovat kovové součásti, proto je hudba či mluvené slovo operátora většinou přenášeno z vedlejší místnosti vzduchem ohebnými trubičkami zavedenými do sluchátek na hlavě pacienta.

Vzácnou, ale o to závažnější komplikací vyšetření MRI s podáním kontrastních látek je nefrogenní systémová fibróza (*nephrogenic systemic fibrosis*, NSF)<sup>31</sup>. Vyskytuje se po podání chelátů gadolinia u pacientů v konečné fázi ledvinného selhání a projevuje se charakteristickými kožními změnami (*peau d'orange*) a kontrakturami mnoha klou-

bů, které mohou vést až k imobilizaci pacienta. Léčba spočívá v transplantaci ledvin. Toto onemocnění je intenzivně studováno; patofyziologický mechanismus jeho vzniku není přesně znám. Existuje mnoho hypotéz, nejčastěji diskutovaná je založena na dechelataci komplexů gadolinia. To by vedlo k vyplavení volných gadolinitých kationtů, vzhledem ke stabilitě komplexů sice ve velmi malém množství, které ale stačí k aktivaci cirkulujících fibrocytů k proliferaci. Tato hypotéza se opírá o průkaz gadolinitých iontů v kůži pacientů s NSF a o několikanásobné prodloužení biologického poločasu látky v organismu u pacientů s ledvinným selháním.

## 2.2 Porfyriny v lidském těle

Porfyrinovou strukturu obsahuje velké množství biomolekul. Jedná se o aktivní centrum, které poskytuje proteinům charakteristické katalytické a komplexační vlastnosti. V lidském těle je nejčastějším centrálním atomem železo.

Porfyrin obsažený v lidském těle v největším množství je hem, tvořící spolu s proteinovou částí molekulu hemoglobinu. Jedná se o tetramer nejčastěji dvou podjednotek  $\alpha$  a dvou podjednotek  $\beta$ , obsahující tak celkem čtyři molekuly hemu. Hlavní funkce hemoglobinu je transport kyslíku z plic do kapilár. Ten spočívá v koordinaci molekuly kyslíku na centrální atom  $\text{Fe}^{2+}$ , čímž se z deoxyhemoglobinu stává oxyhemoglobin. Jednotlivé podjednotky spolu interagují a po navázání kyslíku na jednu z nich je usnadněna vazba i na ostatní. Díky tomu má hemoglobin typickou sigmoidní saturační křivku pro kyslík a umožňuje mu to vázat maximální množství kyslíku při jeho parciálním tlaku v plicních alveolech a stejně tak maximální množství kyslíku vyvést při parciálním tlaku typickém pro žilní krev. Oxydaci centrálního atomu železa z  $\text{Fe}^{2+}$  na  $\text{Fe}^{3+}$  vzniká neaktivní methemoglobin. Hemoglobin je obsažen v červených krvinkách v koncentraci přibližně 35 g/dl. Při jejich rozpadu a uvolnění do krevní plazmy je navázán proteinem haptoglobinem, který inhibuje jeho oxidativní aktivitu, čímž chrání tkáň před oxidativním stresem, a odnáší jej k degradaci do sleziny, aby nedocházelo ke ztrátám železa v organismu ledvinami.

Kromě hemoglobinu se hem vyskytuje v dalších transportních proteinech pro kyslík, jako je myoglobin ve svazech a neuroglobin v nervové tkáni. Ty váží kyslík s vyšší afinitou než hemoglobin a urychlují tak difuzi kyslíku z kapilár do příslušné tkáně. Hem obsahují také pro život zásadní enzymy, jako např. cytochrom C umožňující buněčné dýchání a cytochrom P450 zodpovědný za jaterní detoxifikaci organismu.

Biosyntéza hemu vychází z 5-D-aminolevulinové kyseliny (5-ALA). Ta vzniká ze sukcinyl-koenzymu A a glycinu dekarboxylací katalyzovanou enzymem ALA-syntázou. Ze dvou molekul ALA vzniká za katalýzy ALA-dehydratázou pyrolová molekula označovaná jako porfobilinogen (PBG). Ze čtyř molekul PBG vytváří PBG-deamináza hyd-



roxymetylbilan, který má tetrapyrolovou strukturu, ovšem s neuzavřeným kruhem. Oba koncové pyroly jsou uroporfyrinogen III-syntázou spojeny za vzniku uroporfyrinogenu III. Ten je přes koproporfyrinogen III a protoporfyrinogen IX dekarboxylací příslušných COOH skupin a oxidací přeměněn na protoporfyrin IX, který má již v celém tetrapyrolovém jádru aromatickou povahu a je samotným ligandem hemu. Hem pak vzniká koordinací  $\text{Fe}^{2+}$  do středu protoporfyrinu IX za katalýzy enzymu ferochelatázy. Enzymové deficity v jednotlivých krocích této syntézy způsobují kumulaci prekurzorů hemu; tato onemocnění se souborně označují jako porfyrie. Typickým příznakem některých porfyrií je citlivost na světlo, jejíž příčinou jsou oxidativní účinky porfyriinů po fotoexcitaci, které způsobují poškození tkání. Tohoto mechanismu se – ovšem řízeně – využívá při tzv. fotodynamické terapii, při níž se po podání porfyrinových fotosenzitizérů ničí nádorové tkáně cíleným osvitem.

U operací vysoce maligních gliových nádorů se někdy předoperačně podává pacientům 5-ALA. Ta se v nádorových buňkách kumuluje a dochází k rychlé produkci protoporfyrinu IX. Zde se využívá další vlastnosti porfyrinových struktur – velmi jasné fluorescence. Po osvitu nádorová tkáň jasně září a operátor přesně vidí, jakou oblast má resekovat<sup>32</sup>.

Degradace hemu probíhá v největší míře ve slezině enzymem hem oxygenázou, která štěpí tetrapyrolový kruh za uvolnění molekuly oxidu uhelnatého a železnatého kationtu; vzniká přitom biliverdin. Ten je redukován na bilirubin, který je uvolněn do krevní plazmy. U pacientů se žloutenkou, u nichž se vyskytuje ve zvýšené koncentraci, způsobuje typicky žluté zbarvení pokožky a sliznic. Bilirubin je v jaterních buňkách přeměněn na bilirubin diglukuronid, který je jako žlučové barvivo vylučováno do žlučových cest, jimiž se dostává do střev. Tam je střevními bakteriemi metabolizován na široké spektrum látek, které jinak bledou stolicí barví tmavě. Jedním z nich je urobilinogen, který se ze střev částečně vstřebává zpět do krevní plazmy a je vylučován močí, již poskytuje charakteristické zbarvení.

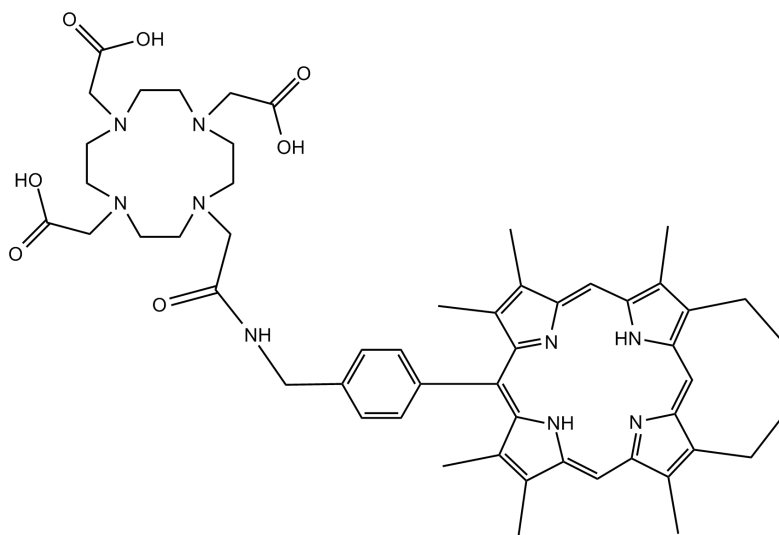
## 2.3 Předchozí práce s konjugáty porfyriinů pro MRI

Makrocikly komplexující gadolinium konjugované s jinými látkami pro získání dalších vlastností jsou poměrně intenzivně studované téma. Byly úspěšně připraveny látky např. na bázi cyklodextrinů<sup>35</sup>, které mají vysokou  $T_1$ -relaxivitu díky prodloužení rotačního času způsobeného navázáním ligandů na dendrimery o vysoké molekulové hmotnosti. Existují práce, které se věnují přímé koordinaci gadolinitých iontů do středu porfyrinové molekuly a případnému využití takové látky pro MRI<sup>36</sup>.

Experimentálních prací, které by se věnovaly konjugaci ligandů stabilně komplexujících  $\text{Gd}^{3+}$  s porfyrinovými skelety, je však méně. Byl připraven konjugát 8,12-

diethyl-2,3,7,13,17,18-hexamethyl-20-(benzyl-acetamid-N-DO3A)porfyrin ( $H_3(\text{DO3A-AM})\text{-H}_2(\text{Porphyrin})$ ), viz obrázek 2.5) a jeho komplexy s gadoliniem a mědí ( $(\text{DO3A-AM})\text{Gd}(\text{Porphyrin})\text{Cu}$ , ref. <sup>37</sup>). Autoři zamýšlejí využít tento konjugát jako potenciální bimodální kontrastní látku pro MRI a SPECT/PET a bimodální látku pro magnetickou rezonanční mikroskopii a fluorescenční mikroskopii. Pro navázání DO3A je využita pouze jedna strana porfyrinového skeletu, celá molekula tedy obsahuje pouze jeden gadolinitý kation. Funkční spojka je založena na volné aminoskupině skeletu porfyrinu, podobně jako u TPAPP, avšak konjugace neprobíhá s isothiokyano-skupinou, nýbrž s OH-skupinou při aktivaci 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)karbodiimidem (EDC) za vzniku amidu. Relaxivita takto připraveného gadolinového komplexu byla podobná komplexu samotného ligandu DO3A a koordinační sféra  $\text{Gd}^{3+}$  nebyla konjugací nijak změněna.

Obrázek 2.5: Struktura 8,12-diethyl-2,3,7,13,17,18-hexamethyl-20-(benzyl-acetamid-N-DO3A)porfyrinu (ref. <sup>37</sup>).



## 3 Experimentální část

### 3.1 Použité chemikálie

Při syntéze byly použity komerčně dostupné chemikálie (Acros Organics, Aldrich, Fluka, Lachner, Penta, Strem) o běžné čistotě, které nebyly přečišťovány. Při *size-exclusion* chromatografii byly použity komerčně dostupné chemikálie (Merck) v analytické čistotě pro HPLC. Argon a vodík byl použit z tlakové lahve (9,996%, resp. 99,9%, Linde Technoplyn). Deuterovaná rozpouštědla byla dodána firmami Aldrich a Chemotrade.

### 3.2 Použité laboratorní metody

#### 3.2.1 NMR Spektroskopie

NMR spektra byla měřena na přístrojích firmy Varian-Unity INOVA 400, resp. NMRS 300. Užití rezonanční frekvence měřených jader byly 399,95 MHz, resp. 299,94 MHz pro  $^1\text{H}$  NMR a 161,92 MHz, resp. 121,42 MHz pro  $^{31}\text{P}$  NMR. Chemické posuny byly u  $^1\text{H}$  spekter referencovány na signál vnitřního standardu TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ,  $\delta_{\text{H}} = 0,000$  ppm), u  $^{31}\text{P}$  na vnější standard 85% vodného roztoku  $\text{H}_3\text{PO}_4$  ( $\delta_{\text{P}} = 0,000$  ppm), není-li uvedeno jinak.

#### 3.2.2 Size-exclusion chromatografie

Při size-exclusion chromatografii byla použita kolona TOSOH Bioscience TSKgel G2000SW (7,5 mm  $\times$  30,0 cm, velikost částic 10  $\mu\text{m}$ ). Průtok mobilní fáze kolonou byl 0,5 ml/min. Složení mobilních fází je uvedeno přímo v popisu charakterizace produktu. K detekci byl použit UV-VIS detektor Topaz Dual při vlnových délkách 230 nm a 254 nm.

#### 3.2.3 UV-VIS spektroskopie

K měření UV-VIS spekter byl použit přístroj WPA Lightwave II verze 7120 V1.7.0 v rozsahu vlnových délek 200–700 nm s krokem po 1 nm. Vzorky byly během měření v křemenné kyvětě s optickou dráhou 1,0 cm. Sloužení použitých rozpouštědel je uvedeno přímo v popisu charakterizace produktu.

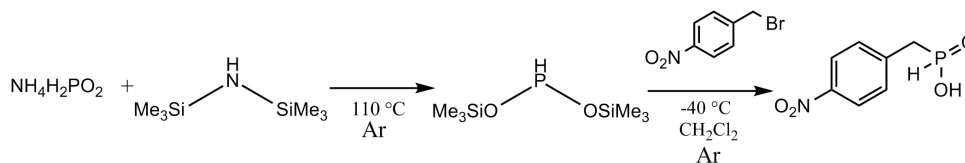
### 3.3 Syntetická část

Syntéza sestává ze dvou procesů: přípravy makrocyclické části sloučeniny a její následné konjugace s porfyrinem. Příprava makrocyclické části byla prováděna dle optimalizovaných postupů a zkušeností na pracovišti<sup>1</sup>, podle nichž byly i odhadnuty molekulové hmotnosti jednotlivých připravovaných látek.

Jako porfyrinová jednotka byl pro konjugaci použit 5,10,15,20-tetrakis(4-aminofenyl)-porfyrin, který je komerčně dostupný v dostatečné čistotě a má volné funkční aminoskupiny potřebné pro konjugaci s pendantním ramenem makrocyclické části molekuly.

#### 3.3.1 Příprava makrocyclické části

Příprava kyseliny 4-nitrobenzylfosfinové (ref.<sup>1</sup>)



Do trojhrdlé 1000ml baňky bylo naváženo 20,0 g (241 mmol)  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_2$ . Baňka byla opatřena míchadlem, septem, chladičem, bublačkou a zaváděcí trubičkou s kohoutem pro přívod argonu. Baňka byla sekurována argonem a pod proudem argonu bylo injekční stříkačkou přes septum pomalu přidáno 100 ml hexamethyldisilazanu (477 mmol). Směs byla ohřívána na olejové lázni při 100–110 °C přes noc v proudu argonu (cca 30 bublinek za minutu).

K reakční směsi bylo poté přidáno 150 ml suchého dichlormethanu. Baňka byla vychlazena v lázni pevný  $\text{CO}_2$ /ethanol na –40 °C. Za stálého míchání byl přes septum během cca 20 min. přidán roztok 23,6 g (109 mmol) 4-nitrobenzylbromidu ve 150 ml suchého dichlormethanu. Mícháno přes noc pod mírným proudem argonu, poté byl proud argonu zesílen a reakční směs přečerpána kanylou do 500 ml ethanolu v dvoulitrové Erlenmeyerově baňce s míchadlem. Zakalený hnědý roztok byl odpařen na rotační vakuové odparce a odparek rozpuštěn ve směsi 300 ml 6M kyseliny chlorovodíkové a 300 ml dichlormethanu. Tato směs byla míchána, až došlo ke krystalizaci části produktu. Pevná fáze byla odfiltrována na fritě S4 a obě kapalně fáze byly odděleny v dělicí nálevce. Vodná fáze byla promyta 5×200 ml dichlorethanu, obě organické frakce byly spojeny s odfiltrovanou pevnou částí a odpařeny do sucha na rotační vakuové odparce. Odparek byl znovu odpařen malým množstvím ethanolu, rozpuštěn ve 150 ml vroucí vody a za horka přefiltrován na fritě S3. Produkt vykrytalizoval přes noc z horkého filtrátu při pokojové teplotě, byl zfiltrován na fritě S3 a dosušen ve vakuovém exsikátoru nad  $\text{P}_2\text{O}_5$ .

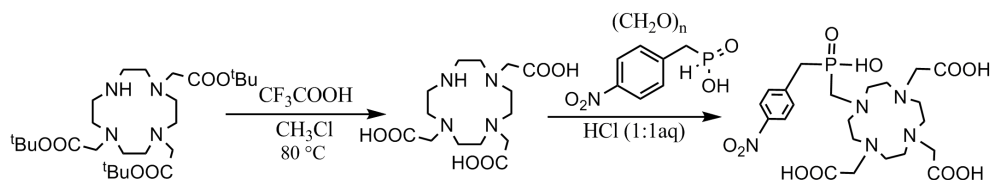
Nerozpuštěná látka byla po filtraci za horka spolu s odpařeným matečným roztokem znovu extrahována ve 100 ml vroucí vody a zfiltrována za horka na fritě S3. Výše popsaná krystalizace byla ještě dvakrát opakována.

Celkový výtěžek byl 10,1 g (57 mmol), tj. cca 50 %.

$^{31}\text{P}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C, 121,42 MHz, 299,94 MHz): 25,54 (dt, 1P,  $^1J_{\text{PH}} = 510,4$  Hz,  $^2J_{\text{PH}} = 17,4$  Hz)

$^1\text{H}$  NMR ( $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C, 299,94 MHz): 8,09 (d, 2H,  $J_{\text{HH}} = 8,4$  Hz, arom.); 7,34 (d, 2H,  $J_{\text{HH}} = 7,5$  Hz, arom.); 6,87 (d, 1H,  $J_{\text{PH}} = 523,4$  Hz, -P-H); 3,02 (d, 2H,  $J_{\text{PH}} = 18,0$  Hz,  $-\text{CH}_2\text{-P-}$ )

**Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl}[(4-nitrofenyl)methyl]fosfinové,  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{NBn}}$  (ref.<sup>1</sup>)**



Do baňky o objemu 100 ml bylo naváženo 5,01 g (8,4 mmol) tris(t-butyl)esteru 1,4,7,10-tetraazacyklododekanu-1,4,7-trioctové kyseliny, přidáno 25 ml chloroformu a 25 ml kyseliny trifluoroctové. Baňka byla obalena alobalem a směs byla přes noc zahřívána při 80 °C na olejové lázni. Potom byla směs odpařena do sucha na rotační odparce, odparek rozpuštěn v malém množství vody a znovu odpařen do sucha.

Přidáno 5,1 g (29 mmol) p-nitrobenzylfosfinové kyseliny, 40 ml HCl (1:1 aq.) a 0,58 g (19,3 mmol) paraformaldehydu. Baňka byla uzavřena plastovou zátkou přidrženou klemou jako pojistkou proti přetlaku a ohřívána přes noc na olejové lázni při 95 °C. Vymizení P-H vazby bylo kontrolováno pomocí  $^{31}\text{P}$  NMR. Vazba byla ještě prokazatelná, proto bylo přidáno 0,51 (17 mmol) a po 4 hodinách dalších 0,26 (8,7 mmol) paraformaldehydu a směs byla dále ohřívána přes noc při 95 °C na olejové lázni.

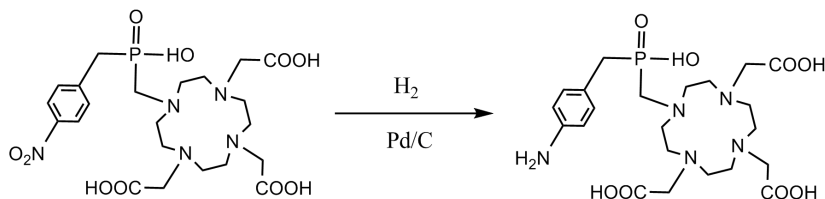
Směs byla odpařena na rotační odparce a dvakrát doodpařena z malého množství vody. Odparek byl rozpuštěn ve 250 ml vody a zfiltrován. Filtrát byl zahuštěn na rotační odparce na cca 50 ml, znovu zfiltrován a přenesen na silný katex (Dowex 50×W4, 100 mesh, 3,5×14 cm,  $\text{H}^+$ -cyklus). Kolona byla promyta 300 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 750 ml EtOH (1:1 aq.). Produkt byl eluován 750 ml 5% vodným roztokem  $\text{NH}_3$ , eluát byl odpařen na rotační odparce, rozpuštěn v malém množství vody a znovu odpařen do sucha. Odparek byl rozpuštěn v 20 ml vody, nanesen na silný anex (Amberlite IRA 420 typ 1, 3,5×25 cm,  $\text{AcO}^-$ -cyklus) a promyt 1000 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a 1000 ml 5% AcOH. Produkt byl eluován 550 ml 3% kyselinou chlorovodíkovou, odpařen na rotační odparce do sucha, rozpuštěn v malém množství vody a znovu odpařen do sucha.

Odparek byl rozpuštěn v 45 ml H<sub>2</sub>O, přidána lžička aktivního uhlí (cca 1 g), zfiltrováno a odpařeno do sucha. Triturováno v 50 ml tetrahydrofuranu po 7 dní, poté zfiltrováno na fritě S3 a vysušeno v exsikátoru nad P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>.

Výtěžek byl 1,9 g (2,7 mmol), tj. 30 %.

<sup>31</sup>P NMR (D<sub>2</sub>O, 25 °C, 299,94 MHz): 33,94 (s, 1P)

**Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-aminofenyl)methyl]fosfinové}, H<sub>4</sub>do3ap<sup>ABn</sup> (ref.<sup>1</sup>)**



V baňce o objemu 100 ml bylo 1,8 g (2,7 mmol) H<sub>4</sub>do3ap<sup>NBn</sup> rozpuštěno ve 40 ml H<sub>2</sub>O, přidáno 0,38 g Pd na aktivním uhlí. Baňka byla promyta postupně nejprve argonem, potom vodíkem. Směs byla redukována 24 hodin pod vodíkovým balónem s detekcí konce reakce pomocí <sup>1</sup>H NMR (úzký signál aromatických vodíků). Směs byla zfiltrována přes trojitý filtrační papír a odpařena na rotační vakuové odparce do sucha. Odparek byl odpařen do sucha z malého množství vody (cca 30 ml) a dvakrát z 50 ml HCl (1:1 aq.) a po čtyři dny triturován v THF. Produkt byl od THF oddělen na fritě S3, prosát vzduchem a sušen v exsikátoru nad KOH.

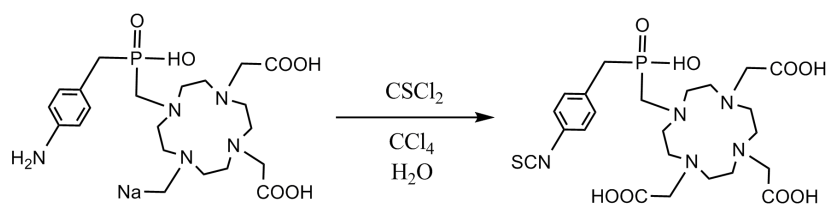
Bylo připraveno 1,6 g (2,5 mmol) H<sub>4</sub>do3ap<sup>ABn</sup> s výtěžkem 85 %.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 25 °C, ref. <sup>t</sup>BuOH): 7,39 (m, 2H, aromatika); 7,47 (m, 2H, aromatika); 3,20–3,97 (m, 28H s integrací odpovídající 30H; –NH<sub>2</sub>, benzyloxy–CH<sub>2</sub>–P, P–CH<sub>2</sub>–N, N–CH<sub>2</sub>–COOH, N–CH<sub>2</sub>–CH<sub>2</sub>–N)

### 3.3.2 Konjugace makrocyklů s porfyrinem

Po převedení volné aminoskupiny H<sub>4</sub>do3ap<sup>ABn</sup> na isothiokyanoskupinu bude takto vzniklý H<sub>4</sub>do3ap<sup>IBn</sup> schopen reagovat s volnými aminoskupinami TPAPP za vzniku N,N'-disubstituované thiomocoviny.

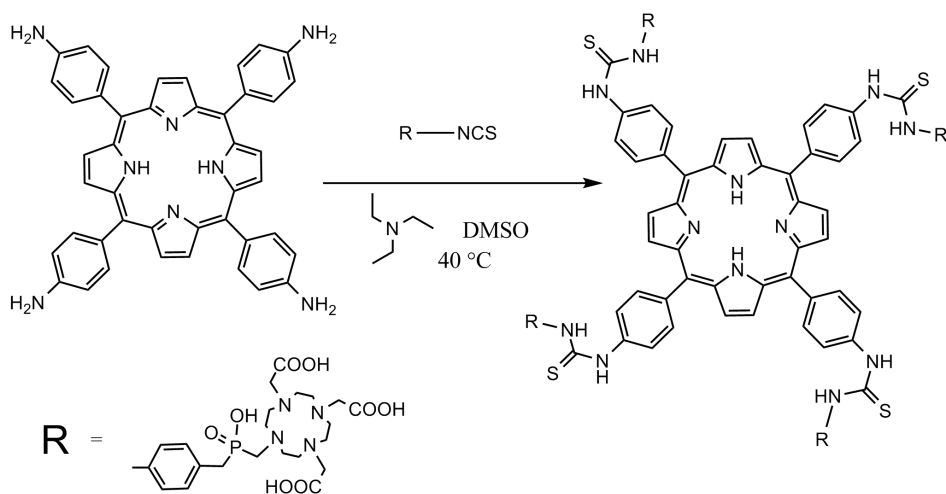
**Příprava kyseliny 1,4,7,10-tetraazacyklododekan-4,7,10-triacetát-1-{methyl-[(4-isothiokyanatanofenyl)methyl]fosfinové}**



V hruškovité 25ml baňce bylo rozpuštěno 0,5 g (0,342 mmol)  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{ABn}}$  v 5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  a byl přidán roztok 140  $\mu\text{l}$  97% thiofosgenu (1,8 mmol) v 5 ml  $\text{CCl}_4$ . Dvoufázová směs byla v utěsněné a alobalem obalené baňce v dobře větrané digestoři velmi intenzivně míchána po dobu 22 hodin. Spodní organická fáze poté byla se zbytky thiofosgenu odsáta injekční stříkačkou a likvidována roztokem amoniaku v ethanolu. Vrchní vodná fáze byla odpařena do sucha na rotační vakuové odparce.

Látka nebyla charakterizována a byla použita přímo k další syntéze.

## Příprava cílové sloučeniny, L<sub>4</sub>-TPAPP



V malé slzovité baňce bylo rozpuštěno 50 mg (75 nmol) TPAPP v 2,5 ml DMSO a přidáno 0,7 ml triethylaminu. Dvofázová směs byla míchána magnetickým míchadlem a ohřívána na vodní lázni při 40 °C.  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}}$  připravený v předchozím reakčním kroku byl přidán k reakční směsi ve čtyřech dávkách po 30 min. a před každou dávkou byla odebrána kapka reakční směsi jako vzorek pro *size-exclusion* chromatografii (viz oddíl 3.3.2). Po 23 hodinách po přidání první dávky  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}}$  byl ohřev ukončen, směs byla převedena do ultrafiltrační cely na celulóзовou membránu (PLAC cellulosic Millipore, velikost pórů 1000 Da) a pod tlakem dusíku 3 bar promyta cca 200 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Obsah ultrafiltrační cely byl odpařen na rotační vakuové odparce do sucha.

Odparek byl vzhledem k přítomnosti triethylaminu potvrzené signálem v  $^1\text{H}$  NMR rozpuštěn v cca 50 ml koncentrovaného roztoku  $\text{NaHCO}_3$  (pH 8,2). V ultrafiltrační byl cele pod tlakem dusíku 3 bar přes celulóзовou membránu (PLAC cellulosic Millipore, velikost pórů 1000 Da) promyt 200 ml nasyceného roztoku  $\text{NaHCO}_3$  a 250 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . Obsah cely byl přefiltrován na fritě S3 od mechanických nečistot a odpařen do sucha na rotační vakuové odparce.

Takto bylo připraveno 0,285 g  $\text{L}_4$ -TPAPP.

$^1\text{H}$  NMR: ( $\text{D}_2\text{O}$ , 25 °C, 299,94 MHz): 7,353 (široký s, aromatické H); 1,7–4,0 (široký složitý m); signály špatně integrovatelné

### Příprava komplexu

10 mg  $\text{L}_4$ -TPAPP bylo rozpuštěno v 0,5 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (pH roztoku 9,4). 3,6 mg (9,3 nmol) hexahydrátu chloridu ytterbitého bylo rozpuštěno v 1 ml  $\text{H}_2\text{O}$  (pH roztoku 5,6). Oba roztoky byly smíchány, vznikl hnědě zakalený roztok o pH 4,6. Postupně pomalu titrováno celkem 5  $\mu\text{l}$  5% vodného roztoku LiOH s výsledným pH 5,49. Roztok míchán magnetickým míchadlem přes noc v lázni o teplotě 40 °C. Poté přidány další 2  $\mu\text{l}$  5% vodného roztoku LiOH, ponecháno znovu přes noc v lázni o teplotě 40 °C s výsledným pH 6,85. Roztok byl odpařen do sucha na rotační vakuové odparce, doodpařen z  $\text{D}_2\text{O}$ , rozpuštěn v NMR kyvetě v  $\text{D}_2\text{O}$ . Bylo naměřeno  $^1\text{H}$  NMR spektrum, které je uvedeno na obrázku 3.1.

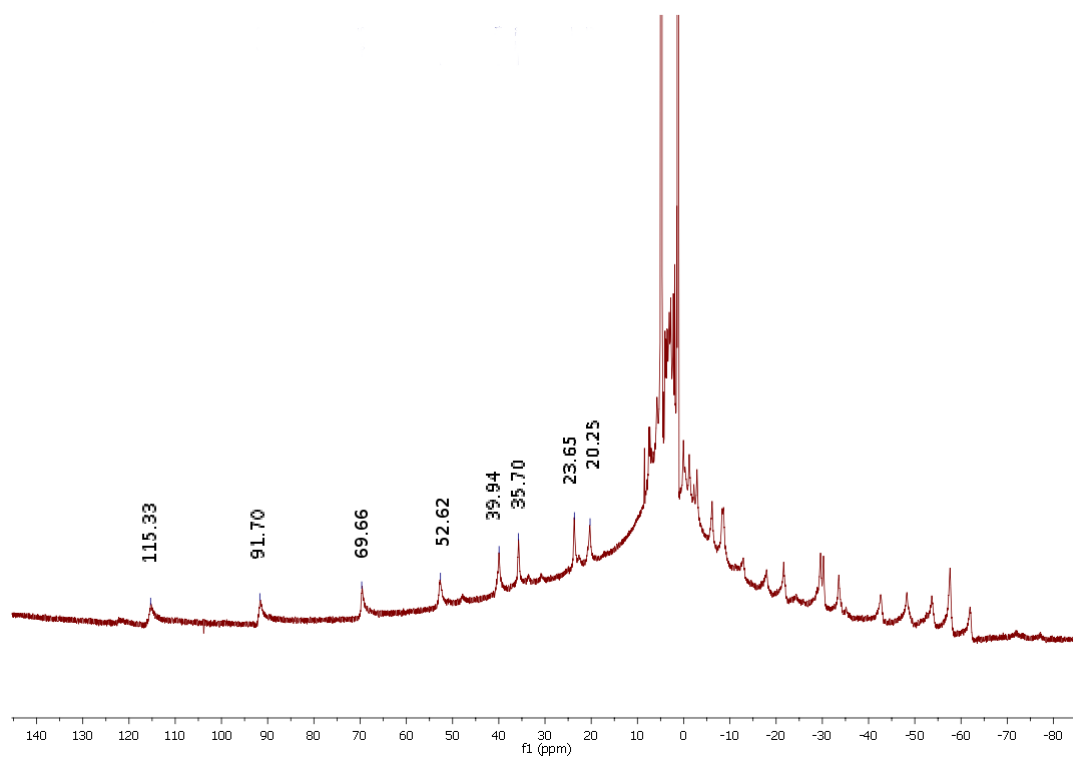
### Charakterizace cílové sloučeniny

Smícháním 0,2M vodného roztoku  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  a 0,1M vodného roztoku kyseliny citronové byly vytvořeny pufrы o pH přibližně 3, 4, 5, 6, 7, a 8. 3,0 mg  $\text{L}_4$ -TPAPP bylo rozpuštěno v 7,000 ml  $\text{H}_2\text{O}$ . 1 ml roztoku  $\text{L}_4$ -TPAPP bylo přidáno ke 2 ml každého pufru. Obdobně bylo postupováno i s volným TPAPP. Od každého vzorku bylo změřeno pH a UV-VIS absorpční spektrum. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku 3.2. Absorpční spektrum komplexu  $\text{L}_4$ -TPAPP s ytterbiem bylo naměřeno v pufru o pH 7 a je zobrazeno na obrázku 3.3.

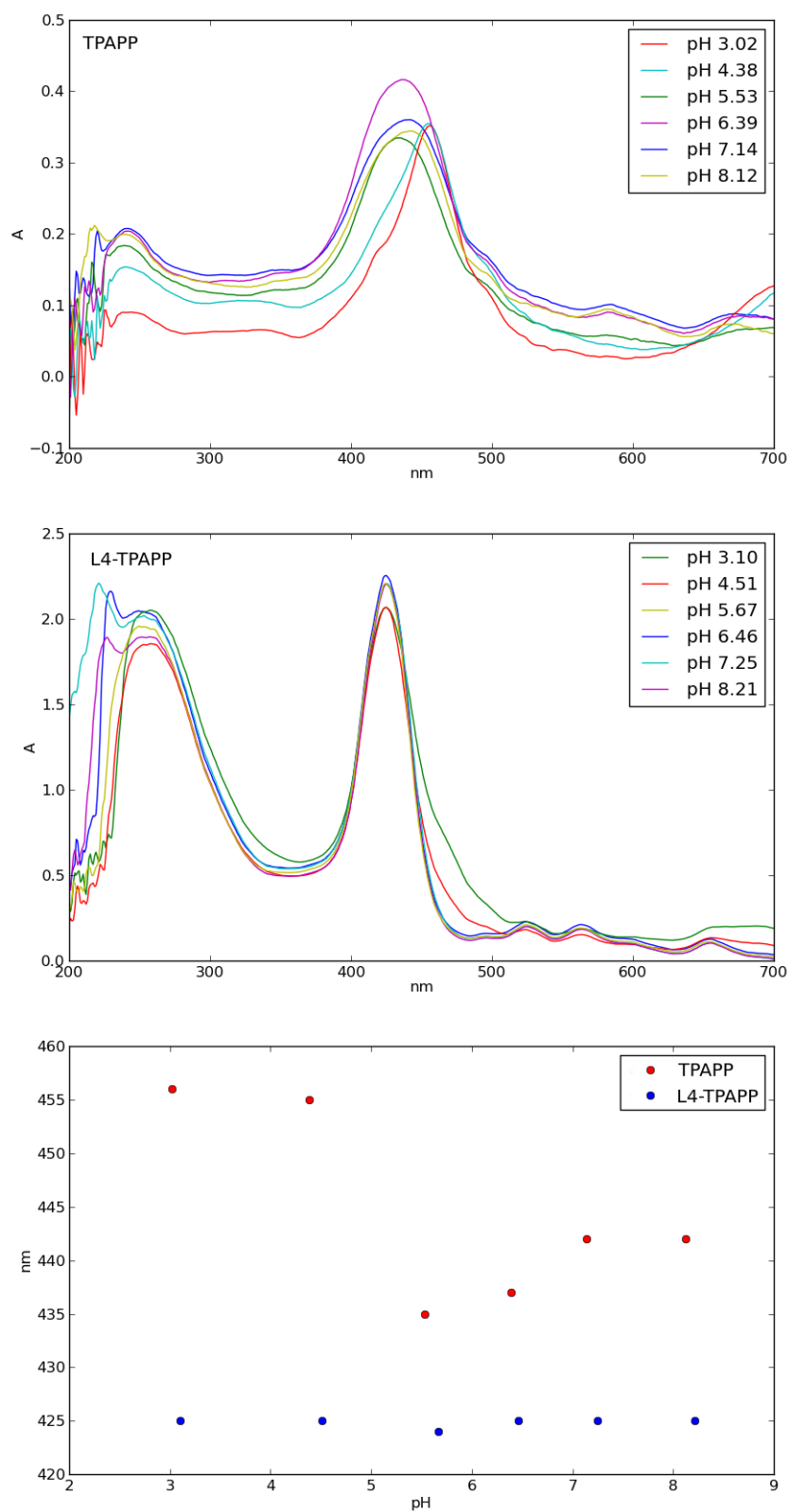
Pro charakterizaci pomocí size-exclusion chromatografie byly testovány různé podmínky (0,1M fosfátový pufr o pH 7,30; 0,1M acetáto-amonný pufr o pH 7,30; 0,1M acetáto-amonný pufr o pH 6,86) a nejlepší separace bylo dosaženo s mobilní fází 0,1M acetáto-amonným pufrem titrovaným 100% kyselinou octovou na pH 6,86. Průtok mobilní fáze byl 0,5 ml/min. Celý vzorek protekl kolonou do 35 minut. Z UV-VIS detektoru byla registrována absorbance při dvou vlnových délkách 230 nm a 254 nm. Aplikovány byly vzorky z průběhu konjugace: vzorek č. 1 (30 min. po přidání 1. dávky a těsně před přidáním 2. dávky  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}}$ ), vzorek č. 2 (30 min. po přidání 2. dávky a těsně před přidáním 3. dávky  $\text{H}_4\text{do3ap}^{\text{IBn}}$ ), vzorek č. 3 (30 min. po přidání 3. dávky

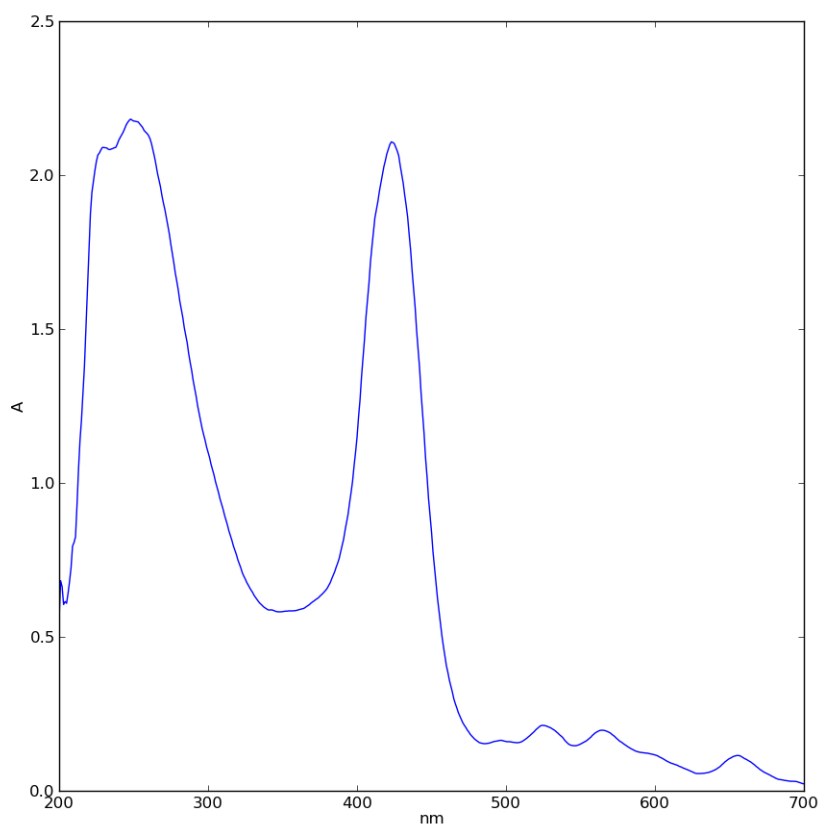


Obrázek 3.1:  $^1\text{H}$  NMR spektrum komplexu ytterbia s  $\text{L}_4\text{-TPAPP}$  ( $\text{D}_2\text{O}$ ,  $25^\circ\text{C}$ , 300 MHz). Peaky označené chemickými posuny přísluší čtyřem signálům vodíků dvou izomerů DOTA-like komplexů.



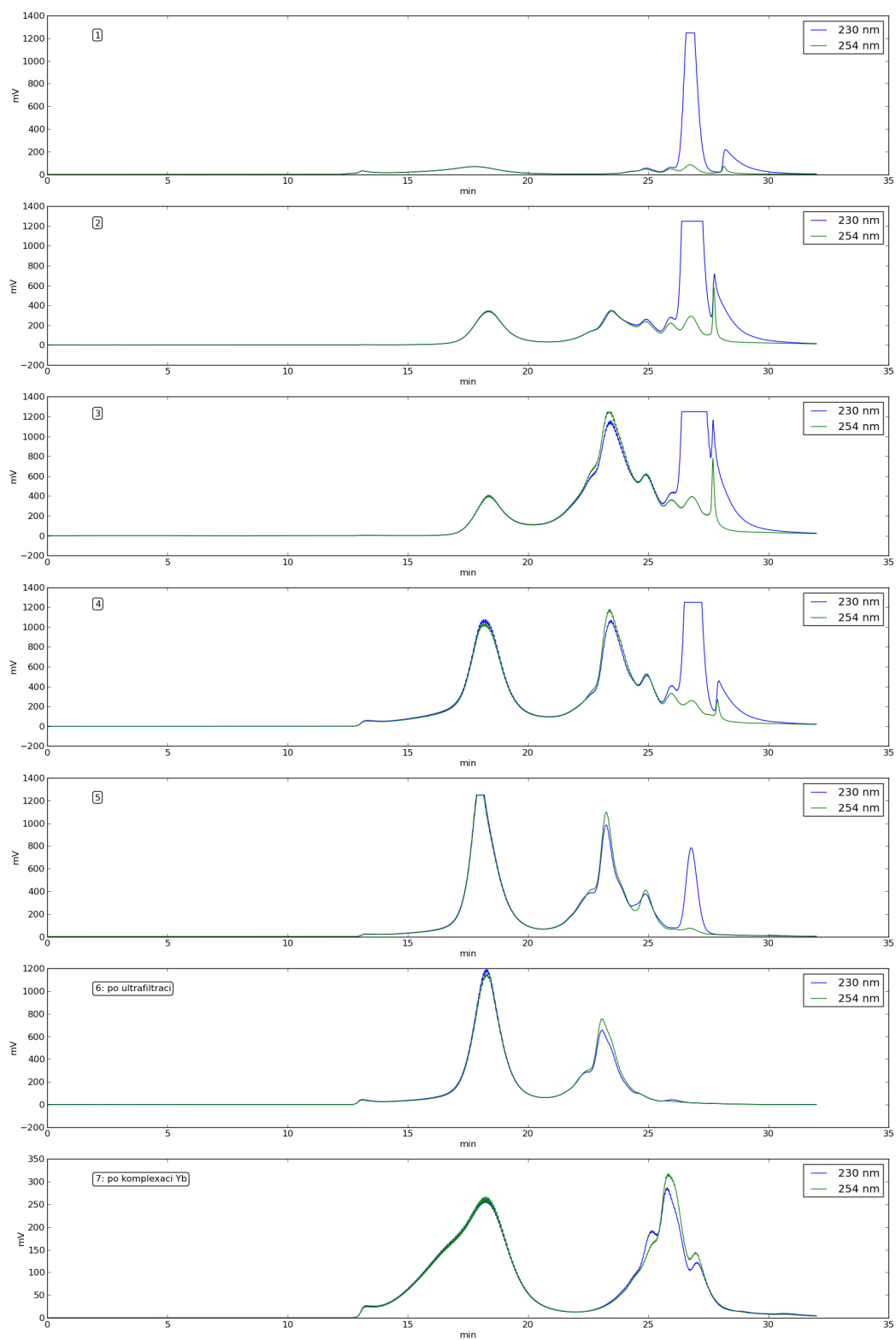
Obrázek 3.2: Absorpční spektra TPAPP (*nahoře*) a L<sub>4</sub>-TPAPP (*uprostřed*) při různých pH a závislost absorpčního maxima obou látek na pH (*dole*).



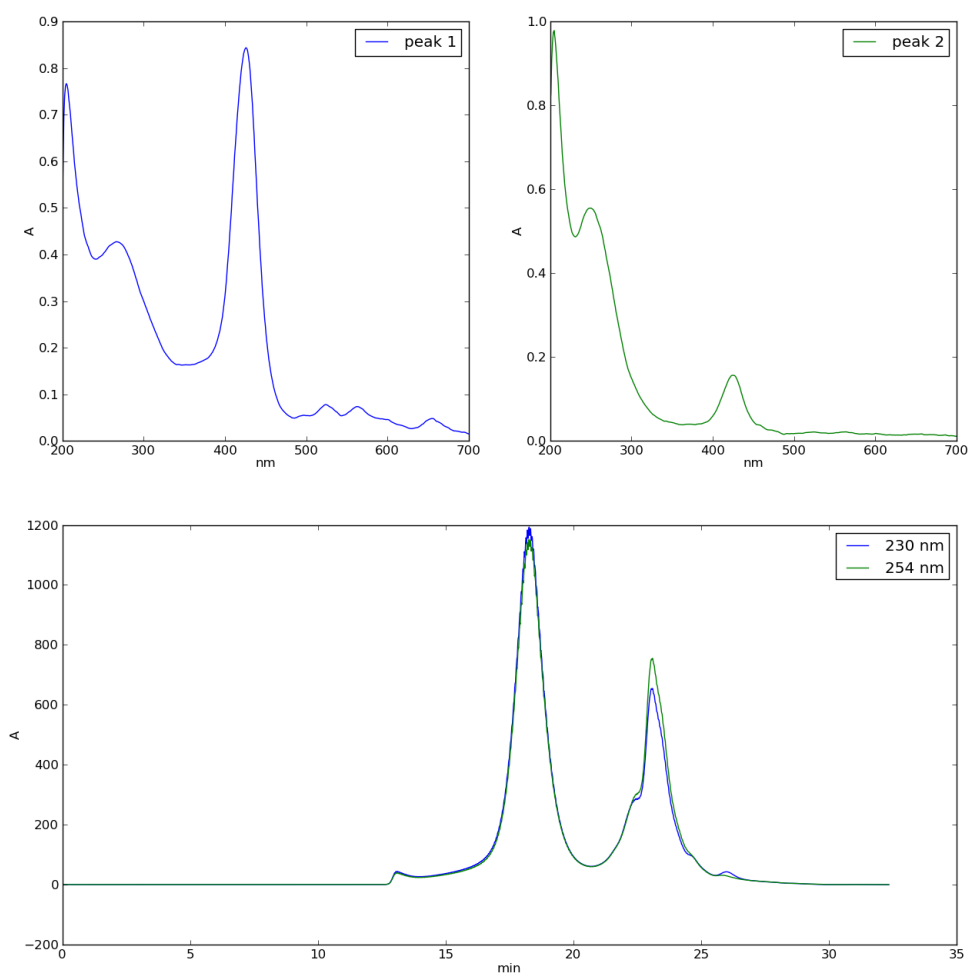
Obrázek 3.3: Absorpční spektrum komplexu  $L_4$ -TPAPP s ytterbiem při pH 7.

a těsně před přidáním 4. dávky  $H_4do3ap^{IBn}$ , vzorek č. 4 (30 min. po přidání poslední dávky  $H_4do3ap^{IBn}$ ), vzorek č. 5 (21 hodin po přidání poslední dávky  $H_4do3ap^{IBn}$ ), vzorek konjugátu po ultrafiltraci (č. 6) a vzorek konjugátu po komplexaci  $Yb^{3+}$  (č. 7). Výsledky jsou znázorněny na obrázku 3.4. Během chromatografie vzorku z konjugátu po ultrafiltraci byl první peak (retenční čas 18 min.) i druhý peak (retenční čas 23 min.) separován a přímo v mobilní fázi byla naměřena jejich absorpční spektra, která jsou uvedena na obrázku 3.5.

Obrázek 3.4: Size-exclusion chromatografie jednotlivých vzorků (*shora dolů*): 30 min., 60 min., 90 min., 120 min., 23 hod. od začátku konjugace, po ultrafiltraci a po komplexaci  $\text{Yb}^{3+}$ .



Obrázek 3.5: Absorpční spektra peaku s retenčním časem 18 min. (*vlevo*) a peaku s retenčním časem 23 min. (*vpravo*), které byly separovány při size-exclusion chromatografii ultrafiltrovaného konjugátu (*dole*).



## 4 Výsledky a diskuze

V teoretické části byl zpracován přehled užití v současné době registrovaných kontrastních látek v klinické medicíně, a to v rozsahu, jaký odpovídá chemicky zaměřené bakalářské práci. Přestože byl text koncipován tak, aby byl srozumitelný pro chemickou veřejnost, nebylo možné se vzhledem k tématu zcela vyhnout lékařské terminologii. Tento přehled demonstroval, že praktické použití cílených kontrastních látek, které fungují na jiném principu než pasivní difuze, je velmi omezené. Uvedené příklady ilustrují, jaký vliv může mít aplikace kontrastních látek na pacienta a na prognózu a léčbu jeho onemocnění.

V experimentální části byla prezentována vlastní příprava konjugátu TPAPP a  $H_4do3ap^{ABn}$ . Příprava makrocyclu probíhala v souladu se zkušenostmi pracoviště. Při samotné konjugaci se objevilo několik komplikací, které provedení navržené syntézy ztěžovaly. Ačkoliv konjugace makrocyclu  $H_4do3ap^{IBn}$  s volnými aminoskupinami byly testovány v různých rozpouštědlech, nejvíce zkušeností je s konjugací ve vodném prostředí, v němž TPAPP není rozpustný; konjugace tedy musela probíhat v DMSO. Z tohoto rozpouštědla s vysokým bodem varu lze produkt jen obtížně získat na rotační vakuové odparce, ale vzhledem k tomu, že v dalším kroku byla směs po konjugaci zpracovávána ultrafiltrací, DMSO protekl ultrafiltrační membránou s filtrátem a produkt byl převeden do vodného prostředí.

Konjugace probíhá slabě bazicky katalyzovaně, jako báze byl tedy použit triethylamin. Ukazuje se, že produkt tvoří s triethylaminem sůl, což způsobí, že se triethylamin při ultrafiltraci nevymývá. Je proto nutné jej v roztoku nahradit hydrogenuhličitanem, což lze učinit promýváním reakční směsi v ultrafiltrační cele dostatečným množstvím nasyceného roztoku  $NaHCO_3$ .

Produkt  $L_4$ -TPAPP má teoretickou molekulovou hmotnost 2961 Da. Pro konjugaci bylo použito 50 mg (75 nmol) TPAPP, čemuž by při uvedené molekulové hmotnosti odpovídalo teoretické množství produktu pouhých 0,222 mg, bylo však připraveno 0,285 g produktu. Skutečná molekulová hmotnost je určitě mnohem vyšší vzhledem k navázaným iontům a dalším malým molekulám; to však k vysvětlení několikařádkového rozdílu množství zřejmě nestačí. Nejpravděpodobnějším vysvětlením je, že vzniklý produkt není čistý a je z velké části tvořen vedlejšími produkty přebytku  $H_4do3ap^{IBn}$ .

Při reakci teoreticky vznikají postupně  $L_1$ -TPAPP,  $L_2$ -TPAPP,  $L_3$ -TPAPP, až konečně výsledný  $L_4$ -TPAPP. V použitém nadbytku  $H_4do3ap^{IBn}$  by měly dle zkušeností pracoviště reagovat aminoskupiny kvantitativně. Uvedené meziproducty jsou zřejmě patrné v size-exclusion chromatografii v časech 23–26 minut (obrázek 3.4). Z přebytku  $H_4do3ap^{IBn}$  vzniká jeho dimer, který má molekulovou hmotnost cca 1100 Da, což je přibližně velikost pórů ultrafiltrační membrány. Předpokladem bylo, že promytím velkým objemem vody bude možné produkt přechistit i od látky s takto hraniční molekulovou hmotností. Vedlejší produkt obsažený v připravené látce může být právě nevymytý dimer  $H_4do3ap^{IBn}$ , ale size-exclusion chromatografie napovídá, že vzniká velké množství látky s ještě vyšší molekulovou hmotností než  $L_4$ -TPAPP (peak s retenčním časem 18 minut). Pro přiřazení  $L_4$ -TPAPP peaku s retenčním časem 23 minut a ne peaku s retenčním časem 18 minut, který tedy musí příslušet ještě těžší molekule, svědčí skutečnost, že retenční čas se po komplexaci  $Yb^{3+}$  na rozdíl od peaku příslušejícímu pravděpodobně  $L_4$ -TPAPP nezměnil. Absorpční maxima látek tvořící oba tyto peaky jsou shodně 424 nm (viz obrázek 3.5), což odpovídá Soretovu pásu volného TPAPP (viz obrázek 3.2) i absorpčnímu maximu komplexu  $L_4$ -TPAPP s ytterbiem. U peaku s retenčním časem 18 min. jsou dokonce patrné i Q-pásky IV, III a I (ref.<sup>38</sup>) shodující se i s absorpčními spektry  $L_4$ -TPAPP a jeho komplexu s ytterbiem. To napovídá, že látky tvořící oba peaky jsou porfyrinové povahy. V literatuře byly popsány „sendvičové struktury“ porfyrinů<sup>39</sup> tvořící různé makromolekulární struktury o různých molekulových hmotnostech. Ty by případně mohly vysvětlit dva různé peaky, nevysvětlí však rozpor v množství vzniklých látek.

Je nutná optimalizace syntetických a separačních metod a kompletní charakterizace produktu. V size-exclusion chromatografii byly peaky s retenčním časem 24 minut a 18 minut dobře rozděleny. Použita při tom byla kolona ze silikagelu. Silikagel tedy může být vhodnou náplní kolony i pro separační metody v preparativním množství.

Protože běžně dostupné přístroje nejsou příliš vhodné pro patřičně velké molekulové hmotnosti, nepodařilo se připravené struktury charakterizovat hmotnostní spektroskopií. Spektra z NMR jsou u takto velkých molekul s nízkou čistotou nepřehledná. Ze spekter NMR po komplexaci  $Yb^{3+}$  prokazatelně vyplývá, že komplex části obsahující DO3A s ytterbiem skutečně vzniká (obrázek 3.1). Volný makrocyclus s molekulovou hmotností kolem 700 Da je menší než póry ultrafiltrační membrány, takže by neměl být v produktu přítomen; jedná se tedy s největší pravděpodobností o samotný  $L_4$ -TPAPP. NMR spektrum komplexu by bylo možné vysvětlit i přítomností dimeru  $H_4do3ap^{IBn}$  nevymytého ultrafiltrací. Tomu však v size-exclusion chromatografii pravděpodobně odpovídá peak s retenčním časem 27 minut, který po ultrafiltraci mizí.

Charakterizace pomocí UV-VIS spektroskopie prokazuje, že porfyrinový skelet musel být při reakci modifikován (obrázek 3.2). Volný porfyrin vykazuje změny absorpce-

ního spektra při různém pH a je špatně rozpustný ve vodě v zásaditém prostředí. Absorpční spektrum připraveného  $L_4$ -TPAPP se od volného TPAPP liší – i vizuálně změna barvy při reakci ze zelené, při větší koncentraci až černé, do žlutohnědé. Při různých pH se absorpční spektrum neměnilo, což mluví pro skutečnost, že produkt již nemá u porfyrinové jednotky volné aminoskupiny, které by se mohly protonovat a deprotonovat.

Další fyzikálně-chemické vlastnosti látky  $L_4$ -TPAPP nebylo možné ověřit, jelikož látka nebyla připravena v dostatečném množství a čistotě. Již dříve připravený komplex konjugátu porfyrinu s makrocyklem má podobnou relaxivitu jako volný ligand DO3A<sup>37</sup> (viz oddíl 2.3). U komplexů látky  $L_4$ -TPAPP to bude podobné či bude relaxivita pravděpodobně ještě vyšší, protože molekula obsahuje čtyři místa pro koordinaci  $Gd^{3+}$  a má mnohem vyšší molekulovou hmotnost, což prodlužuje rotační čas. Využití jako kontrastní látky pro MRI se tedy jeví jako možné.

Při BOLD fMRI se využívají zejména  $T_2$  vážené časy, GBCA ovlivňují zejména kontrast v  $T_1$  váženém čase. Kontrastní látky založené na gadoliniu mají však i vysokou  $T_2$ -relaxivitu<sup>21</sup>, navíc by se mohly navzájem ovlivňovat periferně koordinované gadolinité ionty a centrálně koordinovaný železnatý kation. Je těžké odhadnout, zda by makrocykly v  $L_4$ -TPAPP stericky nebránily koordinaci kyslíku jako u hemoglobinu a do jaké vlastnosti by to ovlivňovalo oxidativní vlastnosti látky pro okolní tkáň. Koordinace  $O_2$  by pravděpodobně neodpovídala fyziologické saturační křivce hemoglobinu se sigmoidním tvarem, která je způsobena interakcemi podjednotek hemoglobinu, takže není zaručeno, že by se kyslík koordinoval v tepenné krvi a vyvázal v krvi žilní, což by umožňovalo použít komplexy  $L_4$ -TPAPP k zobrazování funkce tkání v podobě cévního zásobení. Koordinace molekuly kyslíku je však unikátní vlastností porfyrinových systémů, kterou jiné kontrastní látky nemají, a proto by komplexy  $L_4$ -TPAPP mohly být přinejmenším vhodným studijním modelem látek reagujících na parciální tlak kyslíku in vitro. Při statistickém zpracování dat podobném jako u fMRI by se také mohlo vzhledem k centrálnímu  $Fe^{2+}$  jednat o bimodální kontrastní látku  $T_1$  a  $T_2$ . Do centra porfyrinové jednotky je možné koordinovat i  $\beta^+$ -zářič  $^{64}Cu$ ; to dovolí použití komplexu  $L_4$ -TPAPP jako bimodální kontrastní látky pro  $T_1$ -MRI a PET. Fluorescenčních vlastností porfyrinu by se dalo také využít ve fluorescenční mikroskopii a vlastností GBCA při magnetické rezonanční mikroskopii.

Metabolismus a vylučování nových látek se obtížně odhaduje, předpovědní modely jsou nepřesné a vždy je nutné experimentální měření na modelech zvířecích. Biomolekuly porfyrinů jsou v těle metabolizovány a vylučovány játry (viz oddíl 2.2). Pokud by to splňovala i látka  $L_4$ -TPAPP, jednalo by se o další intracelulární kontrastní látku kumulující se ve žluči, jíž by šlo využít k zobrazování hepatobiliárních cest.



## 5 Závěr

Ze získaných výsledků lze formulovat následující závěry:

1. Byl vypracován přehled klinicky využívaných kontrastních látek pro MRI. Dále bylo popsáno několik konkrétních příkladů ilustrujících jejich indikace a přímý vliv kontrastních látek na diagnostiku a následnou léčbu pacienta.
2. Na základě tohoto přehledu byla navržena příprava konjugátu porfyrinu s makrocyklem chelatujícím lanthanoidy, který je potenciální kontrastní látkou pro funkční zobrazování pomocí MRI.
3. Navržená syntéza byla experimentálně vyzkoušena a připravený produkt byl částečně charakterizován, čímž byl prokázán vznik produktu navrženou cestou.

## 6 Literatura

- [1] MÁDLOVÁ, M. *Tetraazamakrocikly na kalix[4]arenovém skeletu a jejich komplexy s lanthanoidy*. Diplomová práce. Univerzita Karlova v Praze, Praha 2009.
- [2] CARR, H. Y. *Free Precession Techniques in Nuclear Magnetic Resonance. Thesis (PH.D.)*. HARVARD UNIVERSITY, 1953. [cit. podle CARR, H. Y. *Field Gradients in Early MRI*. Physics Today. 2004, roč. 57, č. 7, s. 83. DOI: 10.1063/1.1784322. Dostupné z: <http://link.aip.org/link/PHTOAD/v57/i7/p83/s1>]
- [3] CARR, H. Y.; PURCELL, E. *Effects of Diffusion on Free Precession in Nuclear Magnetic Resonance Experiments*. Physical Review. 1954, roč. 94, č. 3, s. 630-638. DOI: 10.1103/PhysRev.94.630. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.94.630>
- [4] LAUTERBUR, P. C. *Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance*. Nature. 1973-3-16, roč. 242, č. 5394, s. 190-191. DOI: 10.1038/242190a0. Dostupné z: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/242190a0>
- [5] LAUTERBUR, P. C. *Magnetic Resonance Zeugmatography*. Pure and Applied Chemistry. 1974, roč. 40, č. 1-2, s. 149-157. DOI: 10.1351/pac197440010149. Dostupné z: <http://iupac.org/publications/pac/40/1/0149>
- [6] MANSFIELD, P. *Multi-planar Image Formation Using NMR Spin Echoes*. Journal of Physics C: Solid State Physics. 1977-02-14, roč. 10, č. 3, s. L55-L58. DOI: 10.1088/0022-3719/10/3/004. Dostupné z: <http://stacks.iop.org/0022-3719/10/i=3/a=004>
- [7] SIJBERS, J.; SCHEUNDERS, P.; BONNET, N; VAN DYCK, D.; RAMAN, E. *Quantification and Improvement of the Signal-to-noise Ratio in a Magnetic Resonance Image Acquisition Procedure*. Magnetic Resonance Imaging. 1996, roč. 14, č. 10, s. 1157-1163. DOI: 10.1016/S0730-725X(96)00219-6. PMID: 9065906. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0730725X96002196>

- [8] POOLEY, R. A. *AAPM/RSNA Physics Tutorial for Residents: Fundamental Physics of MR Imaging*. Radiographics. 2005-07-01, roč. 25, č. 4, s. 1087-1099. DOI: 10.1148/rg.254055027. PMID: 16009826. Dostupné z: <http://radiographics.rsnaajnl.org/cgi/doi/10.1148/rg.254055027>
- [9] Sartor, K. *MR Imaging of the Skull and Brain: A Correlative Text-Atlas*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1992. ISBN: 978-3-642-75527-9
- [10] UHLENBROCK, D. *MRT und MRA des Kopfes: Indikationsstellung – Wahl der Untersuchungsparameter – Befundinterpretation*. Stuttgart: Thieme, 1996. ISBN 978-313-1035-318.
- [11] ALGER, J. R.; SCHAEWE, T. J.; LAI, T. C.; FREW, A. J.; VESPA, P. M.; ETCHEPARE, M.; LIEBESKIND, D. S.; SAVER, J. L.; KIDWELL, S. C. *Contrast Agent Dose Effects in Cerebral Dynamic Susceptibility Contrast Magnetic Resonance Perfusion Imaging*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2009, roč. 29, č. 1, s. 52-64. DOI: 10.1002/jmri.21613. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.21613>
- [12] DEIBLER, A.R.; POLLOCK, J. M.; KRAFT, R. A; TAN, H.; BURDETTE, J. H.; MALDJIAN, J. A. *Arterial Spin-Labeling in Routine Clinical Practice, Part 1: Technique and Artifacts*. American Journal of Neuroradiology. 2008-01-25, roč. 29, č. 7, s. 1228-1234. DOI: 10.3174/ajnr.A1030. Dostupné z: <http://www.ajnr.org/cgi/doi/10.3174/ajnr.A1030>
- [13] DETRE, J. A.; RAO, H.; WANG, D. J. J.; CHEN, Y. F.; WANG, Z. *Applications of Arterial Spin Labeled MRI in the Brain*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2012, roč. 35, č. 5, s. 1026-1037. DOI: 10.1002/jmri.23581. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.23581>
- [14] WANG, D. J. J.; ALGER, J. R.; QIAO, J. X.; HAO, Q.; HOU, S.; FIAZ, R.; GUNTHER, M.; POPE, W. B.; SAVER, J. L.; SALAMON, N.; LIEBESKIND, D. S. *The Value of Arterial Spin-Labeled Perfusion Imaging in Acute Ischemic Stroke: Comparison With Dynamic Susceptibility Contrast-Enhanced MRI*. Stroke. 2012-03-26, roč. 43, č. 4, s. 1018-1024. DOI: 10.1161/STROKEAHA.111.631929. PMID: 22328551. Dostupné z: <http://stroke.ahajournals.org/cgi/doi/10.1161/STROKEAHA.111.631929>
- [15] DETRE, J. A.; WANG, J.; WANG, Z.; RAO, H. *Arterial Spin-labeled Perfusion MRI in Basic and Clinical Neuroscience*. Current Opinion in Neurology. 2009, roč. 22, č. 4, s. 348-355. DOI: 10.1097/WCO.0b013e32832d9505. Dostupné z: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage>

- [16] JANSEN, O.; FORSTING, M.; SARTOR, K. *Neuroradiologie*: 4. vydání. Stuttgart [u.a.]: Thieme, 2008. ISBN 978-313-1009-142.
- [17] HAHN, E. *Spin Echoes*. Physical Review. 1950, roč. 80, č. 4, s. 580-594. DOI: 10.1103/PhysRev.80.580. Dostupné z: <http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRev.80.580>
- [18] LOGOTHETIS, N. K.; WANDELL, B. A. *Interpreting the BOLD Signal*. Annual Review of Physiology. 2004, roč. 66, č. 1, s. 735-769. DOI: 10.1146/annurev.physiol.66.082602.092845. Dostupné z: <http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.physiol.66.082602.092845>
- [19] BHACHU, D.S.; KANAL, E. *Implantable Pulse Generators (Pacemakers) and Electrodes: Safety in the Magnetic Resonance Imaging Scanner Environment*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2000, č. 12, s. 201-204. DOI: 10.1002/1522-2586(200007)12:1<201::AID-JMRI23>3.0.CO;2-G/abstract. PMID: 10931581. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1522-2586\(200007\)12:1<201::AID-JMRI23>3.0.CO;2-G/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1522-2586(200007)12:1<201::AID-JMRI23>3.0.CO;2-G/abstract)
- [20] ZRINZO, L.; YOSHIDA, F.; HARIZ, M. I.; THORNTON, J.; FOLTYNIE, T.; YOUSRY, T. A.; LIMOUSIN, P. *Clinical Safety of Brain Magnetic Resonance Imaging with Implanted Deep Brain Stimulation Hardware: Large Case Series and Review of the Literature*. World Neurosurgery. 2011, roč. 76, č. 1-2, s. 164-172. DOI: 10.1016/j.wneu.2011.02.029. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1878875011001483>
- [21] AIME, S.; CARAVAN, P. *Biodistribution of Gadolinium-based Contrast Agents, Including Gadolinium Deposition*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2009, roč. 30, č. 6, s. 1259-1267. DOI: 10.1002/jmri.21969. PMCID: PMC2822463 Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.21969>
- [22] REIMER, P.; VOSSHENRICH, R. *Kontrastmittel in der Radiologie*. Der Radiologe. 2013, roč. 53, č. 2, s. 153-164. DOI: 10.1007/s00117-012-2429-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00117-012-2429-6>
- [23] *Molecular Imaging and Contrast Agent Database (MICAD)* [online]. Bethesda (MD): National Center for Biotechnology Information (US); 2004-2013 [cit. 2013-08-26]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK5330/>
- [24] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Public statement on Teslascan (mangafodipir) Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union*. 18.6.2012. [cit. 2013-08-21]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2012/08/WC500130495.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2012/08/WC500130495.pdf)

- [25] EUROPEAN MEDICINES AGENCY. *Public statement on Ablavar (gadofosveset) Withdrawal of the marketing authorisation in the European Union*. 24.10.2011. [cit. 2013-08-21]. Dostupné z: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Public\\_statement/2011/11/WC500117585.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Public_statement/2011/11/WC500117585.pdf)
- [26] STÁTNÍ ÚŘAD PRO KONTROLU LÉČIV. *Databáze léků* [online]. 2013 [cit. 2013-08-21]. Dostupné z: <http://www.sukl.cz/modules/medication/>
- [27] ROVIRA, À. *A Single, Early Magnetic Resonance Imaging Study in the Diagnosis of Multiple Sclerosis*. Archives of Neurology. 2009-05-11, roč. 66, č. 5, s. 587-592. DOI: 10.1001/archneurol.2009.49. Dostupné z: <http://archneur.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/archneurol.2009.49>
- [28] PRICE, D. L.; DE WILDE, J. P.; PAPADAKI, A. H.; CURRAN, J. S.; KITNEY, R. I. *Investigation of Acoustic Noise on 15 MRI Scanners from 0.2 T to 3 T*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2001, č. 13, s. 288–293. PMID: 11169836. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1522-2586%28200102%2913:2%3C288::AID-JMRI1041%3E3.0.CO;2-P/abstract>
- [29] MCJURY, M; SHELLOCK, F. G. *Auditory Noise Associated with MR Procedures: A Review*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2000, č. 1, s. 37–45. PMID: 10931563. Dostupné z: [http://dx.doi.org/10.1002/1522-2586\(200007\)12:1%3C37::AID-JMRI5%3E3.0.CO;2-I](http://dx.doi.org/10.1002/1522-2586(200007)12:1%3C37::AID-JMRI5%3E3.0.CO;2-I)
- [30] LAUER, A. M.; EL-SHARKAWY, A. M.; KRAITCHMAN, D. L.; EDELSTEIN, W. A. *MRI Acoustic Noise Can Harm Experimental and Companion Animals*. Journal of Magnetic Resonance Imaging. 2012, roč. 36, č. 3, s. 743-747. DOI: 10.1002/jmri.23653. PMID: 22488793. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jmri.23653>
- [31] IDÉE, J. M.; PORT, M.; MEDINA, C.; LANCELOT, E.; FAYOUX, E.; BALLE, S.; COROT, C. *Possible Involvement of Gadolinium Chelates in the Pathophysiology of Nephrogenic Systemic Fibrosis: A Critical Review*. Toxicology. 2008, roč. 248, č. 2-3, s. 77-88. DOI: 10.1016/j.tox.2008.03.012. PMID: 18440117. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X08001431>
- [32] COLDITZ, M. J.; JEFFREE, R. L. *Aminolevulinic Acid (ALA)–protoporphyrin IX Fluorescence Guided Tumour Resection. Part 1: Clinical, Radiological and Pathological Studies*. Journal of Clinical Neuroscience. 2012, roč. 19, č. 11, s. 1471-1474. DOI: 10.1016/j.jocn.2012.03.009. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0967586812001749>

- [33] KUPKA, K.; KUBINYI, J.; ŠÁMAL, M. *Nukleární medicína*. 1. vyd. Praha: P3K, 2007. ISBN 978-809-0358-492.
- [34] NEKULA, J.; HEŘMAN, M.; VOMÁČKA, J.; KÖCHER, M. *Radiologie*. 3. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého, 2005, 205 s. ISBN 80-244-1011-7.
- [35] KOTKOVÁ, Z.; HELM, L.; KOTEK, J.; HERMANN, P.; LUKEŠ, I. *Gadolinium Complexes of Monophosphinic Acid DOTA Derivatives Conjugated to Cyclodextrin Scaffolds: Efficient MRI Contrast Agents for Higher Magnetic Fields*. Dalton Transactions. 2012, roč. 41, č. 43, s. 13509-13519. DOI: 10.1039/C2DT30858D. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c2dt30858d>
- [36] SHAHBAZI-GAHROUEI, D. *Gadolinium-porphyrins: New Potential Magnetic Resonance Imaging Contrast Agents for Melanoma Detection* Journal of Research in Medical Sciences. 2006, roč. 11, č. 4, s. 217-223. Dostupné z: <http://journals.mui.ac.ir/jrms/article/view/165>
- [37] GROS, C. P.; EGGENSPILLER, A.; NONAT, A.; BARBE, J. M.; DENAT, F. *New Potential Bimodal Imaging Contrast Agents Based on DOTA-like and Porphyrin Macrocycles*. Medicinal Chemistry Communications (MedChemComm). 2011, roč. 2, č. 2, s. 119-125. DOI: 10.1039/c0md00205d. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c0md00205d>
- [38] GIOVANNETTI, R.; UDDIN, J. (Ed.). *The Use of Spectrophotometry UV-Vis for the Study of Porphyrins, Macro To Nano Spectroscopy*. Rijeka: InTech, 2012. ISBN: 978-953-51-0664-7. DOI: 10.5772/38797. Dostupné z: <http://www.intechopen.com/books/macro-to-nano-spectroscopy/the-use-of-spectrophotometry-uv-vis-for-the-study-of-porphyrins>
- [39] CHABACH, D.; TAHIRI, M.; DE CIAN, A.; FISCHER, J.; WEISS, R.; BIBOUT, M. E. M. *Tervalent-Metal Porphyrin-Phthalocyanine Heteroleptic Sandwich-Type Complexes. Synthesis, Structure, and Spectroscopic Characterization of Their Neutral, Singly-Oxidized, and Singly-Reduced States*. Journal of the American Chemical Society. 1995, roč. 117, č. 33, s. 8548-8556. DOI: 10.1021/ja00138a009 Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00138a009>